

Departement für Pferde der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich
Direktor: Prof. Dr. med. vet., Dr. h.c. Jörg A. Auer, MS, Dipl. ACVS/ECVS

Musculoskeletal Research Unit (MSRU)
Leiterin: Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, Dipl. ECVS

***Posterolaterale Fusion im Schafmodell: PTH₁₋₃₄ -
Knochenersatzstoffe versus Positiv-und Negativkontrolle***

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der Vetsuisse Fakultät
Universität Zürich

vorgelegt von

Bernadette Linsbichler
aus
St. Andrä am Zicksee (Österreich)

Genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, Referentin
Prof. Dr. med., Dr. h.c. Max Aebi, Korreferent

Zürich 2009

Meinen Eltern
Bernadette und Josef Linsbichler

In Liebe und Dankbarkeit.

Zusammenfassung	1
Summary.....	2
1 Einleitung.....	4
1.1 Ziel der Studie.....	5
2 Literaturübersicht.....	6
2.1 Knochenersatzstoffe	6
2.1.1 „Der ideale Knochenersatzstoff“	6
2.1.2 Knochenersatzstoffe im klinischen Alltag.....	7
2.1.3 Die kontroverse Diskussion über die Osteoinduktivität von Knochenersatzstoffen	8
2.1.4 Die Integration von Kalziumphosphatkeramiken	10
2.1.5 Mikro-makroporöse biphasische Kalziumphosphatkeramiken (MBCP)....	13
2.2 Fibrin als Trägersubstanz für Biomaterialien	15
2.2.1 Koagulationskaskade und Wundheilung	15
2.2.2 Fibrinprodukte	15
2.2.3 Wirkt Fibrin osteoinduktiv?.....	17
2.2.4 Fibrinprodukte als Trägersubstanz für Knochenersatzstoffe und als lokales „Delivery System“	19
2.3 PTH.....	20
2.3.1 Allgemeine Physiologie.....	20
2.3.2 Die paradoxe Wirkung von PTH auf den Knochen.....	21
2.3.3 Systemische Anwendung von PTH ₁₋₃₄	23
2.3.4 Lokale Anwendung von PTH ₁₋₃₄	25
2.4 Erkrankungen der Lendenwirbelsäule	26
2.5 Chirurgische Therapiemöglichkeiten und Outcome unterschiedlicher Fusionsmethoden	28
2.6 Posterolaterale lumbale Fusion.....	30
2.6.1 Instrumentierte und uninstrumentierte posterolaterale lumbale Fusion	30
2.6.2 Komplikationen der instrumentierten posterolateralen Fusion.....	32
2.6.3 Routinediagnostik	34
2.6.4 Die Korrelation zwischen erfolgreicher Fusion und klinischer Situation .	35
2.6.5 Ossifikation und Einflussfaktoren	36
2.6.6 Wann genau ist eine Fusion stabil?	38
2.7 Das Schaf als Versuchsmodell für die instrumentierte posterolaterale lumbare Fusion	40
3 Material und Methoden.....	42
3.1 Verwendete Materialien.....	42
3.2 Schafmanagement.....	44
3.3 Studienaufbau	45
3.4 OP	47
3.4.1 Präoperatives Management und Anästhesie	47
3.4.2 OP Technik	49
3.4.3 Postoperatives Management	51
3.5 Evaluierungsmethoden ante mortem	52
3.5.1 Röntgen.....	52

3.5.2 Computertomographie.....	53
3.6 Evaluierungsmethoden post mortem.....	55
3.6.1 Probengewinnung, makroskopische Beurteilung und Röntgen	55
3.6.2 Probenaufbereitung und Histologie.....	57
3.7 Statistik.....	61

4 Resultate.....	62
4.1 Operation und postoperative Phase	62
4.2 Ergebnisse der radiologische Beurteilung.....	64
4.2.1 Röntgen	64
4.2.2 Computertomographie.....	67
4.2.3 Faxitron	71
4.3 Ergebnisse der makroskopischen Beurteilung der Segmente	72
4.4 Mikroradiographische Beurteilung	75
4.5 Ergebnisse der histologischen Beurteilung	75
4.5.1 Qualitative Beurteilung der Dickschnitte.....	75
4.5.2 Beurteilung der Dünnschnitte.....	78
4.5.3 Beurteilung der Weichteilproben	78

5 Diskussion	79
5.1 Operation und postoperative Phase	79
5.2 Radiologische Beurteilung	80
5.3 Makroskopische Beurteilung und Beurteilung der Weichteilproben.....	85
5.4 Qualitative Beurteilung der Dickschnitte.....	88
5.5 Beurteilung der Dünnschnitte.....	91
5.6 Perspektiven	92

6 Literaturverzeichnis.....	93
-----------------------------	----

7 Abkürzungsverzeichnis	105
-------------------------------	-----

8 Anhang	106
8.1 Abbildungen	106
8.2 Tabellen.....	115

Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurde die instrumentierte posterolaterale Fusion anhand eines Schafmodells näher untersucht. Die Studie wurde anhand einer Präliminär- und einer Hauptstudie aufgebaut. Im Rahmen der Präliminärstudie wurde die Fusion in Kombination mit autologem Knochen als Positivkontrolle (Gruppe B) mit einer Negativkontrolle (Gruppe A), bei der lediglich eine Dekortizierung bei leerem Fusionsbett, durchgeführt wurde, verglichen. In der anschliessenden Hauptstudie wurden 2 experimentelle Gruppen (Gruppe C: Fibrin+ PTH₁₋₃₄, Gruppe D: Fibrin+PTH₁₋₃₄ +MBCP) sowohl untereinander als auch mit den in der Präliminärstudie ermittelten Ergebnissen der Positiv-und Negativkontrollen zum Zeitpunkt 12 Wochen nach der Operation evaluiert. Die Gruppen der Vorstudie wurden 12 Monate lang jeden Monat röntgenologisch und computertomographisch untersucht. Die Gruppen der Hauptstudie wurden bereits nach 4 Monaten euthanasiert und wurden bis zu diesem Zeitpunkt einmal nach 3 Monaten computertomographisch untersucht. Post mortem wurden alle Proben makroskopisch, röntgenologisch und histologisch evaluiert. Aufgrund der röntgenologischen Untersuchung konnte ein Fusionszeitraum in den Gruppen der Vorstudie zwischen 7 und 9 Monaten anberaumt werden. Die computertomographische Auswertung der Bildsequenzen der Vorstudie ergab einen Fusionszeitraum von 10 bis 11 Monaten. Im computertomographischen Vergleich aller Gruppen 3 Monate nach der Operation konnte gezeigt werden, dass in den Gruppen A, B und D eine Fusionsrate von 21-40 % erreicht wurde, während in Gruppe C lediglich eine Fusionsrate von 0-20 % erzielt wurde. In der makroskopischen Beurteilung konnte eine vollständige Fusion in allen Segmenten aller Gruppen festgestellt werden. Die Knochenmassenzunahme war in Gruppe A 12 Monate nach der Operation höher als in Gruppe B, in Gruppe C 3 Monate nach der Operation höher als in Gruppe D. Die Beurteilung der Faxitronbilder post mortem ergab 1 Jahr nach der Operation eine vollständige Fusion in den Gruppen A und B der Vorstudie und unvollständige Fusionen in den Segmenten der Gruppen C und D der Hauptstudie 4 Monate nach der Operation. Bei der qualitativen histologischen Evaluierung der Dickschnitte konnte festgestellt werden, dass sich die Gruppe A und B lediglich im Lamellenknochenanteil unterschieden. In Gruppe A konnte mehr und wesentlich ausdifferenzierter Lamellenknochen festgestellt werden als in Gruppe B. In den beiden Gruppen der Hauptstudie war der Anteil an Geflechtknochen 4 Monate postoperativ sehr hoch. Die

Knochenneubildung wurde in Gruppe C höher eingeschätzt als in Gruppe D. In den Gruppen A, B und C wurde neuer Knochen über enchondrale Ossifikation gebildet, in der Gruppe D über Desmale. Anzeichen einer akuten Entzündungsreaktion waren in keiner der Proben zu finden. In den Gruppen C und D konnten Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen als Anzeichen einer immunologischen Reaktion auf das verwendete Biomaterial gefunden werden. In Gruppe D wurden bei Betrachtung der Dünnschnitte zudem eine grosse Anzahl an Makrophagen und Riesenzellen festgestellt.

Summary

The aim of this study was to generate a standardized instrumented posterolateral lumbar fusion model in sheep using a pedicle screw system, to compare positive (autograft) and negative (empty) controls concerning fusion rates and fusion time points and to compare obtained results with two experimental groups.

Therefore the study was divided into two parts: In a preliminary study negative controls (group A: empty) were compared to positive controls (group B: autograft) during one year of observation. In the following main study two experimental groups (group C: Fibrin+PTH, group D: Fibrin+PTH+MBCP) were at first compared with each other and then with the obtained results of groups A and B twelve weeks postoperatively. In groups A and B radiographic assessment was done by plain radiography and CT scans on a monthly basis until sacrifice at 12 months, whereas in groups C and D CT scans were performed only once at 3 months after surgery. The sheep of groups C and D were sacrificed 4 months postoperatively. After sacrifice radiographic, macroscopic and histologic evaluations of the samples were performed. Radiographic evidence of fusion in groups A and B could be seen between 7 and 9 months after surgery. Depending on computed tomography scans the highest fusion rates in groups A and B were achieved 10 to 11 months after surgery. Three months after surgery a fusion rate of 21-40% could be observed in groups A, B and D, whereas in group C the highest overall fusion rate was 0-20%. The macroscopic assessment of the PLF demonstrated continuous solid posterolateral fusions with bridging bone over the facet joints as well as no detectable motion at the fused segments in all groups. The bone bridging size in group A was judged larger than in group B twelve months after surgery and was larger in group C than in group D four months after surgery. The radiographic examination of the lumbar segments showed complete fusion in groups A and B 1 year after surgery and

incomplete fusion in groups C and D four months after surgery. Qualitative histologic examination at 12 months revealed more mature lamellar bone in group A compared to group B and huge amounts of immature woven bone in groups C and D at 3 months. Bone formation in groups A, B and C occurred by means of enchondral ossification, in group C new bone was built by intramembraneous ossification. In none of the samples signs of acute inflammation could be observed. In groups C and D lymphocytes, plasma cells and macrophages could be detected as an immunologic response to the implanted biomaterials. Macrophages and multinuclear giant cells could be detected in the thin slices of group D.

1 Einleitung

Chronische Rückenbeschwerden stellen in zivilisierten Ländern die teuerste Volkskrankheit dar und zählen zu den Hauptursachen für Arbeitsunfähigkeit und Frühpensionierung. Der Aufwand an medizinischen Rehabilitationsmassnahmen ist enorm und die Behandlungskosten nagen massiv an den Ressourcen des allgemeinen Gesundheitswesens. 80% der Bevölkerung in zivilisierten Ländern leiden irgendwann in ihrem Leben an akuten Rückenschmerzen. In 90% der Fälle dieser Rückenpatienten bessern sich binnen 6 Wochen. Problematisch sind die restlichen 10%. Bei diesen Patienten lassen die Schmerzen nicht nach und es kann eine Chronifizierung eintreten. Die Prävalenz von Rückenschmerzen verhält sich in den verschiedenen Berufs- und Altersgruppen nahezu gleich. Beschwerden beginnen bereits im Schulkindalter und erreichen ihren Höhepunkt zwischen 35 und 55 Jahren. EU-weit belaufen sich die jährlichen Behandlungskosten von chronischen Rückenschmerzen auf rund 200 Milliarden Euro, was in etwa der gesamten jährlichen Wirtschaftsleistung eines Landes wie Dänemark oder Polen entspricht. Eine optimale Behandlung wäre daher nicht nur aus medizinischer Sicht im Hinblick auf Heilung und Schutz vor den verhängnisvollen sozialen Folgen von betroffenen Patienten interessant, sondern könnte auch zu einer massiven Kostenreduktion im Gesundheitswesen beitragen¹. Vor etwa 70 Jahren wurde die lumbale Wirbelfusion als Standardeingriff bei chronischen Rückenleiden eingeführt. Das Konzept der Wirbelfusion beruht auf der Annahme, dass der Schmerz durch Bewegungen in erkrankten Wirbelsegmenten entsteht. Durch eine primäre Stabilisierung mit nachfolgender Ankylose des betroffenen Wirbelsäulenabschnittes werden Bewegungen unterbunden und der Schmerz kontrolliert. Von allen Wirbelfusionsmethoden wird heute die instrumentierte posterolaterale lumbale Fusion als vorteilhafteste und populärste Methode angesehen. Als Goldstandard und Positivkontrolle für andere Biomaterialien bei diesem Verfahren gilt nach wie vor der Einsatz von autologem Knochen. In den vorhandenen Studien stehen jedoch exzellente Fusionsraten im krassen Gegensatz zu hohen Pseudoarthroseraten und schlechten klinischen Ergebnissen². Nur wenig randomisierte kontrollierte Studien geben Aufschluss auf ungefähre Fusionsraten und Fusionszeiträume. Die angegebenen Fusionszeiträume und Fusionsraten der Positivkontrolle variieren sowohl in Humanstudien als auch in Tiermodellen eklatant. Bei Menschen und nicht humanen Primaten werden Zeitintervalle von 6 Monaten bis zu 2-3 Jahren bis zur erfolgreichen

Fusion publiziert, bei Schafen von wenigen Wochen bis zu einem Jahr und im Kaninchenmodell werden erfolgreiche Fusionen in einer Zeitspanne von 4-10 Wochen anberaumt³⁻¹¹. Ein Vergleich mit Negativkontrollen, bei denen das Fusionsbett im Rahmen der instrumentierten posterolateralen Fusion leer belassen wird ist unseres Wissens in keiner der Literaturstellen beschrieben. Von niederen Individuen weiss man, dass eine Fusion oft schon durch Dekortizierung oder Manipulationen am Periost erzielbar ist. Überlegungen dieser Art werfen die Frage auf, ob autologer Knochen als Goldstandard der posterolateralen Fusion nicht überbewertet oder aufgrund seiner positiven Auswirkungen in anderen Lokalisationen des Skelettsystems fehlinterpretiert wird. Der Vergleich von neuen Biomaterialien mit autologem Knochen als Positivkontrolle gestaltet sich aus Mangel an Ergebnissen der Negativkontrolle und aus Mangel einer standardisierten Positivkontrolle daher äusserst schwierig und vorhandene Ergebnisse müssen kritisch betrachtet werden. Eine Reihe von Komplikationen, die mit der Verwendung von autologem Knochen einhergehen, macht die Suche nach äquivalenten oder besseren Ersatzstoffen dringend notwendig. Vergleichende Rückschlüsse vom Einsatz diverser Biomaterialien in anderen orthopädisch relevanten Lokalisationen haben sich aufgrund der vom restlichen muskuloskeletalen System komplett abweichenden biomechanischen Situation in der Wirbelsäule auch nicht bewährt. Kein anderer Bereich der Wirbelsäulenchirurgie hat mehr Kontroversen und Debatten aufgeworfen als die Wirbelfusion, bei keiner anderen orthopädischen Indikation wird die Suche nach einer rationalen Therapie intensiver betrieben als in der Behandlung chronischer therapieresistenter Wirbelsäulenprobleme¹¹⁻¹⁴.

1.1 Ziel der Studie

Die vorliegende Studie wurde anhand einer Präliminär- und einer Hauptstudie aufgebaut. Im Schafmodell wurde im Rahmen der Präliminärstudie die instrumentierte posterolaterale lumbale Fusion in Kombination mit autologem Knochen als Positivkontrolle (Gruppe B) mit einer Negativkontrolle (Gruppe A), bei der lediglich eine Dekortizierung bei leerem Fusionsbett, durchgeführt wurde, über einen Zeitraum von 12 Monaten verglichen. Die Ziele der Präliminärstudie waren ein standardisiertes Schafmodell für die instrumentierte posterolaterale lumbale Fusion mit Pedikelschraubensystem zu etablieren, die genauen Fusionszeiträume und Fusionsraten der Negativ - und Positivkontrollen zu ermitteln und untereinander zu vergleichen und

Standardwerte für die Positivkontrolle und Negativkontrolle im Schafmodell zu bestimmen, die später für eine Beurteilung von Knochenersatzstoffen herangezogen werden können. In der anschliessenden Hauptstudie wurden 2 experimentelle Gruppen (Gruppe C: Fibrin+ PTH₁₋₃₄, Gruppe D: Fibrin+PTH₁₋₃₄ +MBCP) sowohl untereinander als auch mit den in der Präliminärstudie ermittelten Ergebnissen der Positiv-und Negativkontrollen zum Zeitpunkt 12 Wochen nach der Operation verglichen. Bislang wurden nach unserer Kenntnis weder Positivkontrollen und experimentelle Gruppen mit „leeren“ Negativkontrollen über einen langen Zeitraum verglichen, noch wurde lokal appliziertes modifiziertes PTH₁₋₃₄ alleine oder in Kombination mit MBCP im Rahmen der instrumentierten posterolateralen Fusion angewendet und über einen kürzeren Zeitraum verfolgt. Insofern wollten wir untersuchen, ob die Auffrischung der Facettengelenke und Instrumentierung mit Pedikelschraubensystem im Schafmodell ausreicht eine stabile Fusion zu erzielen, wann genau beide Gruppen der Präliminärstudie fusionieren und ob die Anwendung von PTH₁₋₃₄ alleine oder in Kombination mit MBCP vor allem zu Beginn der Fusion zu vergleichbaren Ergebnissen wie die Positivkontrolle führt.

2 Literaturübersicht

2.1 Knochenersatzstoffe

2.1.1 „Der ideale Knochenersatzstoff“

Autologer Knochen und Knochenersatzstoffe werden heute für unterschiedliche orthopädische Indikationen eingesetzt und sollen dabei die Knochenheilung fördern und die Knochenneubildung forcieren. Idealerweise sollten sie ohne Ausbildung einer fibrösen Zwischenschicht an die Knochenoberfläche binden (Osteointegration), das Einwachsen von Knochengewebe fördern (Osteokonduktivität), pluripotente Stammzellen zur Differenzierung in Osteoblasten anregen (Osteoinduktivität) und die Knochenneubildung durch Osteoblasten forcieren (Osteogenese). Autologer Knochen erfüllt alle genannten Anforderungen und hat die beste Verträglichkeit aller Materialien („Golden Standard“). Die Entnahme und der Einsatz von Knochentransplantaten wurden erstmals im 17. Jahrhundert beschrieben. Neben langen Röhrenknochen, Manubrium sterni und lokalen Knochenressourcen eignet sich die Crista iliaca am

besten als Donorstelle, weil relativ grosse Mengen an Knochenmaterial entnommen werden können¹⁵. Bei der Transplantation werden vitale Zellen und osteoinduktive Stoffe übertragen. Allerdings überleben nur wenige Osteoblasten die Transplantation, aber es sind viele Vorläuferzellen im Transplantat enthalten, die osteogenetisches Potential aufweisen. Eingesetzt werden sowohl spongiöser, kortikaler als auch kortikospongiöser Knochen. Spongiöser Knochen enthält ursprünglich eine grosse Anzahl vitaler Zellen, exakte Formgebung und Primärstabilität sind jedoch nicht erzielbar. Mit kortikalem Knochen ist zwar eine exakte Rekonstruktion und eine hohe Stabilität möglich, aber es werden wenig vitale Zellen übertragen. Der biologische Ablauf während der Inkorporation des Knochentransplantates beinhaltet die Ausbildung eines Hämatoms, die Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, eine Entzündungsreaktion, die Migration und Proliferation von mesenchymalen Stammzellen, die Ausbildung von fibrovaskulärem Gewebe in und um das Knochentransplantat, das Einwachsen von Blutgefässen, die Resorption des Transplantates und eine desmale und/oder enchondrale Knochenbildung an der Transplantatoberfläche. Ausschlaggebend für die Langzeitintegrität von autologem Knochen ist die mechanische Belastung. Diese führt zu einer Veränderung der anabolen Aktivität von Osteozyten. Ist zu wenig Belastung vorhanden kommt es zur Knochenresorption. Zu den Nachteilen bei der Verwendung von autologem Knochenmaterial zählen eine hohe Entnahmemorbidität, die Gefahr der Verletzung anatomischer Strukturen, verlängerte Operationszeiten, hohe Blutverluste, lokale Ausfallserscheinungen sensorischer Nervenbahnen, chronische Schmerzen und begrenzte Verfügbarkeit. Bei 15% der Patienten sind Schmerzen länger als 3 Monate vorhanden. Die genannten Gründe machen den Einsatz von autologem Knochen zusehends unattraktiv und legen den Grundstein für die Suche nach äquivalenten oder übergeordneten Alternativen¹⁶.

2.1.2 Knochenersatzstoffe im klinischen Alltag

Knochenersatzstoffe können als Alternative oder als Expander für autologen Knochen eingesetzt werden. Das biologische Verhalten von Knochenersatzstoffen wird stark durch ihre chemischen und physikalischen Eigenschaften beeinflusst. Biomaterialien sollten biokompatibel, porös, absorptiv, bioaktiv, osteokonduktiv und abbaubar sein. Sie dienen als Platzhalter für Knochenneubildung, stützen das Periost und geben die aufzubauende anatomische Form vor. Die Knochenresorption und der Knochenaufbau

sollten dabei zeitgleich ablaufen. Biomaterialien sind unbegrenzt verfügbar und haben eine im Vergleich zum Knochen niedrige Resorptionsrate¹⁷. Grundsätzlich werden synthetisch anorganische, synthetisch organische, biologisch anorganische Materialien und Komposite unterschieden. Sie werden durch chemische Spaltung (Hydrolyse) oder durch zelluläre Interaktionen (Makrophagen, Osteoklasten, mehrkernige Riesenzellen) abgebaut¹⁸. Im klinischen Alltag werden hauptsächlich Kalziumphosphatkeramiken eingesetzt. Dazu zählen Hydroxyapatit, α -Trikalziumphosphat, β -Trikalziumphosphat und biphasisches Kalziumphosphat. Hydroxyapatit wurde früher bevorzugt verwendet. Es ist sehr resorptionsstabil, verfügt über eine gute Biokompatibilität und Osteokonduktivität und wird hauptsächlich über zelluläre Resorption abgebaut. Es ist aber schlechter in den Knochenstoffwechsel eingebunden als Trikalziumphosphat. β -Trikalziumphosphat war eine der ersten Kalziumphosphatkeramiken, die verwendet wurde (1920, Albee, Morrison). Es ist sehr gut in den Knochenstoffwechsel eingebunden und weist eine hohe Biokompatibilität und Osteokonduktivität auf. Ein Nachteil von Trikalziumphosphat ist, dass es innerhalb von 6 – 18 Monaten durch Hydrolyse abgebaut und resorbiert wird und neuer Knochen nicht immer zeitlich analog dazu aufgebaut werden kann. Der schnelle Zerfall führt zu großen Volumenverlusten. Daher wird Trikalziumphosphat entweder in Kombination mit weniger schnell abbaubaren Materialien eingesetzt oder dient als Expander für autologes Knochenmaterial¹⁹.

2.1.3 Die kontroverse Diskussion über die Osteoinduktivität von Knochenersatzstoffen

Im Unterschied zu autologem Knochen werden durch Knochenersatzstoffe keine vitalen Zellen übertragen, weshalb Osteoinduktivität im Zusammenhang mit den meisten Knochenersatzstoffen von vielen Forschungseinheiten nach wie vor in Frage gestellt wird. Bereits in den fünfziger und sechziger Jahren des vorigen Jahrhunderts wurden Studien über die ektopische Knorpel - und Knochenbildung nach Implantation von devitalisiertem Gewebe publiziert. Physikalische und chemische Effekte an den Kontaktflächen zwischen Knochen und Implantat und die Wirkung von Wachstumsfaktoren (BMPs) wurden für das Phänomen der ektopischen Knochenbildung in und um Implantate verantwortlich gemacht²⁰⁻²⁴. Heute gibt es eine ganze Reihe von Studien, die die Osteoinduktivität von synthetischen Biomaterialien belegen. Obwohl die Fähigkeit zur Osteoinduktion im Allgemeinen nur

Kalziumphosphatkeramiken zugesprochen wird gibt es einige Berichte von Glaskeramiken, Aluminiumkeramiken und sogar Titan die zu einer ektopischen Knochenbildung geführt haben sollen²⁵⁻²⁷. Eine Fehlinterpretation des Begriffs „Osteoinduktion“ oder inadäquate *in vitro* Methoden zum Nachweis des genauen Osteoinduktionsmechanismus (statische SBF Modelle statt dynamische Modelle) werden diesen Ergebnissen zugrunde gelegt^{28, 29}. Als Voraussetzung für die Osteoinduktivität von Kalziumphosphatkeramiken wird die Ausbildung einer Hydroxyapatitschicht an der Oberfläche der Keramik angesehen. Durch die Freisetzung von Kalzium- und Phosphationen kommt es in der Umgebung des Implantates zu einer Übersättigung beider Ionen. Der isoelektrische Punkt der Keramik ist niedriger als der seiner Umgebung. Diese pH - Unterschiede führen zunächst zu einer Bindung positiver Ionen (Ca^{2+}) an der Implantatoberfläche. Die positiv geladenen Kalziumionen ziehen anschliessend negativ geladene Hydrogenphosphationen an. Durch Nukleation und Kristallisation entsteht knochenähnliches Hydroxyapatit. Die Ausfällung der Ionen führt zu einer Kopräzipitation endogener Faktoren (Proteine, Zytokine). Osteoprogenitorzellen werden angelockt und zur Differenzierung angeregt, wobei Knochen entsteht²⁹. Zaffe erklärte das osteoinduktive Potential von Kalziumphosphatkeramiken anhand von Mikrolithen. Diese sind kalzifizierte Körperchen in den Alveolen der Lunge und verursachen ein sehr seltenes Krankheitsbild. Nicht selten sind diese Strukturen von Knochen umgeben. Der Mechanismus der Knochenbildung scheint derselbe wie bei Kalziumphosphatkeramiken zu sein, mit dem Unterschied, dass Mikrolithen aus autologen Kalziumphosphatressourcen aufgebaut werden. Durch die Wirkung von Osteoklasten und mehrkernigen Riesenzellen werden Ionen mobilisiert und reichern sich in der Umgebung der Mikrolithen an. Dort führen sie zur Bildung von Hydroxyapatit, zur Rekrutierung und Differenzierung von Osteoprogenitorzellen und letztendlich zur Knochenbildung. Interessant ist die Tatsache, dass es sich beim gebildeten Knochen um Lamellenknochen handelt, dessen sofortige Ausbildung normalerweise nur im Zusammenhang mit mechanisch belasteten Gebieten assoziiert wird²⁸. Das Knochengewebe bei ektopischer Knochenbildung durch Kalziumphosphatkeramiken wurde in verschiedenen Studien untersucht und gleicht nahezu physiologischem Knochen. Mineralisierter Knochen mit maturen Osteozyten, Havers-Kanälen, maturem Knochenmark und Osteoid konnte nachgewiesen werden^{30, 31}.

2.1.4 Die Integration von Kalziumphosphatkeramiken

Unter Bioaktivität versteht man die Reaktion des Knochens auf das Implantat, welche eine Adhäsion vom Knochen an der Grenzschicht zum Implantat zulässt. *In vitro* und *in vivo* Tests ergaben, dass sowohl chemische und physikalische als auch zellspezifische Prozesse für die Bindung der Keramik an den Knochen verantwortlich sind. Die Form, die Struktur und die Porosität der Keramik spielen eine entscheidende Rolle bei der Integration. Kalziumphosphatkeramiken werden sowohl vorgeformt (Granula, Keile, Würfel, Zylinder, etc.) als auch pulverförmig (Zement) eingesetzt. Vorgeformte Knochenersatzstoffe haben den Nachteil, dass sie die Kontaktfläche zwischen Knochenoberfläche und Implantat vermindern und folglich Knochen zu einem geringeren Ausmaß einwachsen kann. Zemente passen sich zwar ideal an, werden aber schlechter resorbiert und fördern das Einwachsen von Bindegewebe³². Kalziumphosphatgranula wird in unterschiedlicher Topographie angeboten, Granula mit unregelmässiger Gestalt und runde Granula mit glatter Oberfläche. Die Struktur ist entweder porös oder einheitlich³³. Granula entstehen durch die Agglomeration von unterschiedlich grossen Partikeln. Die Grösse der Partikel, die so genannte Granulometrie, hat starken Einfluss auf die Bioaktivität einer Keramik. Partikel mit geringer Granulometrie (10-20µm) gewährleisten eine grosse Kontaktfläche zwischen Keramik und umliegenden Gewebe, führen zu einer starken Entzündungsreaktion und werden durch direkte Phagozytose sehr schnell abgebaut. Große Partikel (200-400µm) führen zu einer ausgezeichneten Implantat-Knochenverbindung und bieten Zellen eine weite Bindungsfläche an. Malard konnte beispielsweise in seiner Studie zeigen, dass eine Kombination von sehr kleinen und sehr grossen Partikeln zu einer sehr guten Knochen-Implantatverbindung und zu einer sehr schnellen Knochenneubildung führt³⁴. Eine weitere wichtige Eigenschaft von Knochenersatzstoffen im Rahmen ihrer Integration ist die Porosität, welche sich im kortikalen Knochen zwischen 1 und 100µm, im spongiösen Knochen zwischen 200 und 400µm bewegt. Die Grösse, die Anzahl und die Verbindung der Poren untereinander beeinflusst den Transport von Nährstoffen, die Verbindung von Zellen und das Einwachsen von Gewebe³⁵. Die Porosität wirkt sich aber auch auf die Differenzierung von Knochenvorläuferzellen aus, wobei eine hohe Porosität eine weniger entscheidende Rolle spielt als die Verteilung und die Grösse der Poren und die Oberflächenstruktur der Granula³⁶. Bezug nehmend auf die Porendurchmesser zeigte Galois in seiner Studie, dass sich Porengrößen über 80µm

positiv auf die Knochenbildung auswirken³⁷. Zu grosse Porendurchmesser (510µm) führen zu einer etwas schnellen Resorption der Keramik und verringern zumindest anfänglich dadurch den Anteil an neu gebildetem Knochen im Vergleich zu Implantaten mit kleinerem Porendurchmesser³⁸. Die Verbindungen der Poren untereinander dienen als Transportwege für Nährstoffe, Zellen und Blutgefässe. Die Knochenbildung selbst findet in den Poren statt. Daher sollten die Durchmesser der Poren grösser sein als ihre Verbindungsstücke. Um das Einwandern von Osteoblasten zu gewährleisten sollten die Durchmesser der Verbindungsstücke in etwa 50µm groß sein³⁹. Oberflächenreaktivität, eine typische Eigenschaft bioaktiver Keramiken, stellt eine weitere Grundvoraussetzung für eine gute Implantat-Knochenverbindung dar. Während der Implantation kommt es zu Reaktionen im Bereich der Berührungsfläche von Implantat und Knochen, die zu Veränderungen der Oberfläche des Implantates führen. Alle Implantate, die mit biologischen Flüssigkeiten in Kontakt kommen werden zunächst von einer Proteinschicht umgeben. Die Proteine stellen die Grundlage für die Reaktion der Zellen auf das Material dar. Kalziumphosphatkeramiken haben im Vergleich zu anderen Materialien eine hohe Absorptionskapazität für Serumproteine (v.a. Fibronektin und Vitronektin). Beide Proteine führen dazu, dass zelluläre Rezeptoren (v.a. Integrine) an das Implantat binden. Die Zelle selbst wird durch diese Bindung zur Zellteilung, Proliferation, Migration und Differenzierung angeregt. Proteine binden aufgrund von elektrostatischen oder hydrophoben Anziehungskräften. Aber auch die Oberflächenbeschaffenheit der Implantate wirkt sich auf die Bindung von Proteinen aus. Santos untersuchte die Auswirkungen von Oberflächenbeschaffenheit und chemischer Zusammensetzung von Hydroxyapatit, Trikalziumphosphat und Gold auf die Proteinbindung und auf die Zelladhäsion. Die Resultate zeigten, daß die Topographie im Vergleich zum chemischen Aufbau eine stärkere Auswirkung auf die Proteinbindung hat⁴⁰. Das Gewebe zwischen Implantat und Knochen enthält Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen, wobei Makrophagen 70-80% der Zellpopulation ausmachen und eine wichtige Rolle bei der Osteolyse spielen. In einer Studie von Silva et al wurde die Wirkung von biphasischen Kalziumphosphat auf Makrophagen *in vitro* getestet. Es konnte gezeigt werden, dass sich in kürzester Zeit durch elektrostatische Anziehung Agglomerate aus Makrophagen und BCP Partikel ausbilden. In den Makrophagen selbst wurden phagozytierte, freie Kalziumionen nachgewiesen. Ausserdem konnte gezeigt werden, dass Makrophagen Kalziumphosphatpartikel sezernieren, die durch die Bindung an benachbarte Zellen Übergangszonen schaffen, an die sich weitere

Makrophagen binden können⁴¹. Neben Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen sind Osteoklasten massgeblich am Implantatumbau beteiligt. Osteoklasten binden durch Integrine an das Implantat. Die Kalziumphosphatresorption erfolgt durch extrazelluläre Azidifizierung. Durch die aktive Abgabe von Protonen in spezielle extrazelluläre Vakuolen werden Kristalle vom Implantat gelöst und ins Zellinnere der Osteoklasten geschleust. Hier werden sie in kleine Fragmente geteilt und wieder sezerniert^{42, 43}. Osteoklasten werden unter anderem durch Belastung aktiviert. Daher erfolgt die Resorption von Keramiken schneller in Bereichen, die einer grösseren Belastung ausgesetzt sind. In einer Studie von Zyman et al konnte beispielsweise gezeigt werden, dass sich in belasteten Bereichen um die Keramiken mehr Knochenvolumen zubildet als in weniger belasteten Gebieten⁴⁴. Knochen besteht aus organischen und anorganischen Bestandteilen. Die anorganische Komponente besteht hauptsächlich aus Kalziumhydroxyapatit⁴⁵. Durch chemische und zelluläre Abbauprozesse um das Implantat kommt es zu einer Anreicherung von Kalzium – und Phosphationen und zur Bildung von Karbonatapatit, welcher Knochenapatit gleicht. Die Ausbildung von Karbonatapatit an der Oberfläche und in direkter Nachbarschaft von Kalziumphosphatkeramiken führt letztendlich zu einer starken Verbindung von Knochen und Implantat. Neben genannten chemischen und physikalischen Voraussetzungen stellen die mechanische Stabilität des Implantats und ein gut vaskularisiertes Implantatbett weitere essentielle Grundlagen für eine gute Implantat-Knochenverbindung dar. Zusammenfassend kann nun die Integration von Kalziumphosphatkeramiken wie folgt beschrieben werden: Die Inkorporation der Keramik beginnt mit einer durch den chirurgischen Eingriff und durch das Implantat hervorgerufenen entzündlichen Reaktion und wird von Zellproliferation, Migration und Revaskularisierung gefolgt. Die Entzündungsreaktion hat einen besonderen Stellenwert im Rahmen der Knochenbildung. Nach der Implantation bildet sich zunächst ein Hämatom aus. Thrombozyten degranulieren und geben Wachstumsfaktoren in die Umgebung ab. Entzündungszellen, mesenchymale Stammzellen und Fibroblasten werden angelockt und wandern ins Fibrinnetzwerk ein. Während Fibroblasten Kollagen bilden geben Entzündungszellen angiogenetische Faktoren frei. Fibrovaskuläres Gewebe entsteht in und um das Implantat. Die Vaskularisation des Implantates führt zum Eindringen von Zellen, die letztendlich für die Resorption der Keramik verantwortlich sind. Der Abbau der Keramik führt zur Anreicherung von Ionen und zur Kopräzipitation endogener Faktoren. Knochenähnliches Apatit wird an den

Implantatoberflächen gebildet, Osteoprogenitorzellen werden angelockt und zur Differenzierung in Osteoblasten angeregt. Neuer Knochen wird schliesslich über desmale und/oder enchondrale Ossifikation aufgebaut.

2.1.5 Mikro-makroporöse biphasische Kalziumphosphatkeramiken (MBCP)

Biphasisches Kalziumphosphat ist die optimale Zusammensetzung aus leicht löslichem Trikalziumphosphat und stabilem Hydroxyapatit. Zu den Vorteilen dieser Keramik zählen eine kontrollierte Resorption und Knochenbesiedelung und die Ausbildung einer starken Knochen/Implantatverbindung⁴⁶. Das osteoinduktive Potential, ein weiterer Vorteil dieser Keramik, wurde in zahlreichen Studien untersucht und bewiesen. Ihre chemische Zusammensetzung alleine führt jedoch nicht zur Osteoinduktion. Ausschlaggebend scheint eine hohe Mikroporosität und eine damit einhergehende spezielle Mikrostruktur und Oberflächenbeschaffenheit, ein ideales Hydroxyapatit/Trikalziumphosphatverhältnis, Porendurchmesser von über 300 µm zur Gewährleistung von Vaskularisation und Nährstofftransport und eine mechanisch stabile Formulierung zu sein^{47, 48}. Habibovic et al zeigte anhand ihrer Studie, dass biphasische Kalziumphosphatkeramiken in Abhängigkeit von ihrer Struktur und Zusammensetzung ein sehr unterschiedliches osteoinduktives Potential aufweisen können. Im Rahmen eines Vorversuchs wurden 6 biphasische Kalziumphosphatkeramiken in der Muskulatur von Ziegen getestet. Zwei der sechs (2/6) Keramiken führten zu einer ektopischen Knochenbildung. Die beiden osteoinduktiven Keramiken unterschieden sich von den 4 anderen lediglich durch ihre Mikrostruktur. In weiterer Folge wurde eine der beiden osteoinduktiven Keramiken im Bereich der Transversalfortsätze der Lendenwirbelsäule eingesetzt und mit einer nichtosteoinduktiven Keramik verglichen. Auch in dieser Lokalisation führte die osteoinduktive Keramik zu besseren Ergebnissen. Durch diese Erkenntnis und durch eine weitere sehr ähnliche Studie von Habibovic et al konnte die klinische Relevanz der Osteoinduktivität von Kalziumphosphatkeramiken bei orthotopischer Anwendung bewiesen werden^{49, 50}. Ein Nachteil der hohen Mikroporosität osteoinduktiver Keramiken stellt das Auftreten von Mikrofrakturen in lokalisierten Bereichen der Keramik dar. In den frakturierten Bereichen konnte kein neu gebildetes Knochengewebe nachgewiesen werden. Aus diesem Grund werden Keramiken häufig mit adhäsiven Trägersubstanzen kombiniert, die eine Verbesserung der Stabilität

gewährleisten. Habibovic et al testete zu diesem Zweck in ihrer Studie die Kombination mit Polymeren. Die kombinierte Anwendung erwies sich als unvorteilhaft, weil das eingesetzte Gel Mikroporen verstopfte und damit die Oberfläche der Keramik verkleinerte, was in der Folge zu einer geringeren Knochenbildung führte⁴⁹. Gute Erfolge konnten bei einer Kombination mit Fibrin erzielt werden⁵¹. Weshalb gerade Fibrin sich speziell bei orthopädischer Indikation ideal als Trägersubstanz für Biomaterialien eignet wird später im Text erwähnt. Das Verhältnis von HA zu TCP ist grundlegend für die Osteoinduktion, weil ein bestimmter Anteil an leicht löslichem TCP die Voraussetzung für die Ionenübersättigung und folglich für die Ausbildung von Knochenapatit darstellt⁴⁷. Je grösser der Anteil an TCP in einer Keramik ist desto schneller erfolgt ihre Resorption und umso höher ist die Anzahl an Ionen in der Umgebung der Keramik. Die in der Literatur angegebenen optimalen Verhältnisse von HA zu TCP liegen für osteoinduktive Keramiken beispielsweise bei 20% HA zu 80% TCP oder 15% HA zu 85% TCP. Der Anteil an Hydroxyapatit in der Keramik verhindert zu grosse Volumenverluste und sorgt für ihre lang anhaltende Stabilität. Ist der Anteil an Hydroxyapatit aber zu hoch, wird die Keramik nur sehr langsam resorbiert, was eine Ionenübersättigung unmöglich macht und folglich mit verminderter Osteoinduktion und Knochenbildung einhergehen kann⁵²⁻⁵⁴. In einer Studie von Bodde et al wurde beispielsweise biphasisches Kalziumphosphat mit einer Ratio von 75% HA zu 25% TCP im trabekulären Knochen von Schafen mit reinem TCP verglichen. 26 Wochen nach Implantation waren nur noch 36% der Trikalziumphosphatkeramik intakt, während die biphasische Kalziumphosphatkeramik immer noch vollständig vorhanden war. Die Knochenregeneration bei Verwendung der Trikalziumphosphatkeramik war besser als bei Verwendung der schlechter resorbierbaren Keramik⁵⁵. Die Resorption und Osteoinduktivität von Kalziumphosphatkeramiken mit hohem Hydroxyapatitanteil können durch Kombination mit autologem Knochen verbessert werden⁵⁶. In der Humanmedizin wird MBCP erfolgreich in der Frakturbehandlung und in der Kieferchirurgie eingesetzt. Vielversprechende Resultate waren aber auch in der Behandlung von degenerativen Wirbelsäulenerkrankungen zu verzeichnen. Die Anwendung von MBCP in der posterolateralen Fusion zeigte sowohl in Tierstudien, als auch bei Anwendung in der Humanmedizin vergleichbare Ergebnisse zu autologem Knochen. In Humanstudien wurden teilweise sogar Fusionsraten von über 90% bei Verwendung von MBCP erreicht^{54, 57-60}.

2.2 Fibrin als Trägersubstanz für Biomaterialien

2.2.1 Koagulationskaskade und Wundheilung

Bei Verletzung eines Gefäßes heften sich zunächst Thrombozyten an die Kollagenfasern der Gefäßwand, verkleben untereinander und stellen so den ersten provisorischen Wundverschluss her. Durch diese Anlagerung an den Defekt werden Thrombozyten aktiviert und setzen verschiedene Stoffe wie Kalziumionen, Gerinnungsfaktoren, Thromboxan A₂ und Wachstumsfaktoren frei. Einige dieser Stoffe induzieren dann die plasmatische Gerinnung. Dabei vernetzt Fibrin die schon aneinander gelagerten Thrombozyten und festigt den Wundverschluss. Aktivierte Thrombozyten haben auf der Zellmembran einen Rezeptorkomplex (Glykoproteine), der Fibrinogen aus dem Plasma bindet. Fibrin ist ein Protein, dass durch die Einwirkung des Enzyms Thrombin aus der fadenförmigen löslichen Vorstufe, dem Fibrinogen, gebildet wird. Die sich kontrahierenden Thrombozyten ziehen am Fibrinnetz und führen so zu einer Annäherung der Wundränder. Der Fibrinpfropf wird später durch Plasmin, ein Bestandteil des fibrinolytischen Systems aufgelöst. Die Abbauprodukte von Fibrin, die durch proteolytische Verdauung des Netzwerks entstehen, stimulieren die Einwanderung von Monozyten, die sich ihrerseits in Makrophagen transformieren und das Fibrin phagozytieren. Durch Zytokine stimulierte Fibroblasten wandern in das Fibrinnetz ein und produzieren Kollagen. Etwa nach einer Woche ist der gesamte Klot von Fibroblasten durchsetzt, die eine kollagenreiche Matrix bilden und umbauen. Granulationsgewebe entsteht⁶¹.

2.2.2 Fibrinprodukte

Fibrin stellt ein Gerüst für einwandernde Fibroblasten und mesenchymale Zellen dar, wirkt angiogenetisch, hämostatisch und fördert die Bildung von Granulationsgewebe. Im Moment wird es in Gefäß-, Thorax-, Neuro-, Augen-, rekonstruktiver, oraler und maxillofazialer Chirurgie als Hämostatikum und zur Förderung der Wundheilung eingesetzt. Im Rahmen von orthopädischen Eingriffen dient es als Trägersubstanz und biologisches Adhäsiv. Seine Rolle in der Förderung der Knochenheilung ist noch nicht ganz geklärt. Bei den in Europa seit 1970 kommerziell erhältlichen 2 – Komponenten - Fibrinprodukten handelt es sich um gefriergetrocknete homologe Präparate aus menschlichem Plasma. Der eine Teil beinhaltet ein Fibrinogen/Fibronekin/Faktor XIII

Gemisch, der andere Teil besteht aus einem Thrombinkonzentrat. Das Fibrinogenkonzentrat ist in einem antifibrinolytischen Agens gelöst (meistens Aprotinin). Das Thrombinkonzentrat liegt in Kalziumchlorid verdünnt vor. Die Zusammensetzung von homologen Fibrinkonzentraten ist sehr unterschiedlich. Die Fibrinogenkonzentration schwankt in einem Bereich zwischen 50 und 115 mg/ml, die Faktor XIII Konzentration zwischen 5 und 80 U/ml. Thrombin ist ebenfalls menschlichen Ursprungs und bewegt sich in einem Rahmen von 200 bis 600 U/ml. Durch das Mischen der 2 Komponenten werden die letzten Schritte der Koagulationskaskade imitiert. Thrombin katalysiert die Umwandlung der Fibrinogenketten in Fibrinmonomere und aktiviert bei Anwesenheit von Kalziumionen Faktor XIII. Die Fibrinmonomere polymerisieren durch die Ausbildung von Hydrogenbindungen und bilden ein instabiles dreidimensionales Netz von löslichen Fibrinfäden. Faktor XIII wandelt in Anwesenheit von Kalzium als Kofaktor die nicht-kovalenten Bindungen zwischen den Fibrinmonomeren in Kovalente um, was die Stabilität des Pfropfs erhöht und die Anfälligkeit auf Fibrinolyse vermindert. Unter physiologischen Bedingungen werden die kovalenten Bindungen zwischen den Fibrinsträngen nach einer gewissen Zeit durch Plasmin enzymatisch gespalten und der Fibrinpfropf gelöst (Fibrinolyse)⁶²⁻⁶⁴. Aprotinin hemmt die Umwandlung von Plasminogen in Plasmin oder bildet einen Komplex mit Plasmin und hemmt so die Fibrinolyse. Aprotinin ist das am effektivsten antifibrinolytisch wirkende Agens. Der künstliche Erhalt des Fibrinpfropfs über die physiologische Abbaugrenze hinaus, der bislang speziell bei orthopädischen Eingriffen als vorteilhaft angesehen wurde, wird mittlerweile kontrovers diskutiert. Fibrin wird physiologischerweise innerhalb von 2 Wochen abgebaut, neuer Knochen ist aber erst nach 6-12 Wochen sichtbar. Eine Verlängerung der Nutzungsdauer von Fibrin wurde mit einer Verbesserung der Knochenheilung in Verbindung gebracht. In Anlehnung an diese Annahme wurde in einer Studie von Krishnan et al⁶⁵ getestet ob sich der Einsatz von Antifibrinolytika auf die Knochenheilung und die Adhäsionseigenschaften des Fibrinproduktes positiv oder negativ auswirkt. Die Wundheilung bei der Anwendung von Fibringlue ohne antifibrinolytisches Agens wurde eindeutig als besser bewertet und führte vergleichsweise weniger zur Ausbildung von fibrotischem Narbengewebe. Ausserdem konnte festgestellt werden, dass es bei Verwendung von Antifibrinolytika zu einer Hemmung des Knochenwachstums kommt. In Strukturen, die ausschließlich mit Fibrin ohne Zugabe von Aprotinin behandelt wurden, konnten Fibrinresiduen bis zum Tag 15

nachgewiesen werden. Dies führt man auf physiologische Inhibitoren zurück, die bei Anwesenheit von hohen Thrombinkonzentrationen sowohl im Plasma als auch von Zellen gebildet werden. Es scheint als wäre die Bildung einer provisorischen Matrix genau so wichtig wie der nachfolgende Abbauprozess. Durch die Fibrinolyse wird Platz für einwandernde Zellen geschaffen, während inadäquater Abbau zu Fibrose führt⁶⁵. Bei der Herstellung von homologen Fibrin Glue wird natürlich durch genaue Untersuchung der Donoren und durch verschiedene Schritte im Herstellungsprozess darauf geachtet, dass das Risiko der Übertragung von Viren so gering wie möglich gehalten wird. Trotz dieser Anstrengungen konnten bereits Ausbrüche viraler Erkrankungen (HIV, Parvovirose) verzeichnet werden. Autologe Fibrinprodukte enthalten statt humanem Thrombin standardmässig bovines Thrombin, was zu lebensbedrohlichen Koagulopathien (Inhibition von Faktor V) und zur Übertragung der bovinen spongiformen Enzephalopathie führen kann. Ein weiterer Nachteil ist, dass die rheologischen Eigenschaften von autologen Fibrinprodukten schlecht reproduzierbar sind. Vorteilhaft ist allerdings die Modifizierbarkeit im Herstellungsprozess und die damit verbundenen Verbesserungsmöglichkeiten des Präparates durch die Ausnutzung von Wachstumsfaktoren (Platelet enriched plasma z.B.)^{63, 64}.

2.2.3 Wirkt Fibrin osteoinduktiv?

Die osteoinduktive Wirkung von Fibrinprodukten wird nach wie vor kontrovers diskutiert und wurde in einer Reihe von Tierversuchen und klinischen Studien evaluiert^{62, 66-77}. Im Rahmen der Tierstudien konnten beispielsweise im Zusammenhang mit Tibiadefekten und Defekten in der Mandibula keine positiven Eigenschaften von Fibrin in Kombination mit autologem Knochen oder Knochenersatzstoffen auf die Knochenheilung verzeichnet werden^{70, 75, 77}. Positive Auswirkungen von Fibrin waren aber bei der Verwendung in Bohrlöchern und bei intramuskulärer Implantation in Kombination mit Knochenersatzstoffen zu erkennen^{66, 68}. Inwieweit Fibrin alleine osteoinduktiv wirkt oder nur das osteoinduktive Potential von Knochenersatzstoffen begünstigt oder modifiziert wurde in einer Studie von le Guehennec et al evaluiert. In einem Drillhole Kaninchenmodell wurde Fibringlue (Tissucol®) mit mikro-makroporösem biphasischen Kalziumphosphat (MPCP®) kombiniert. Bei alleiniger Anwendung von MBP® lagert sich Knochengewebe direkt an die Oberfläche der Keramik. Bei Kombination mit Fibrin wurde neues Knochengewebe in einer schmalen

Distanz zur Oberfläche der Granula direkt auf dem fibrillären Netzwerk der Fibrinfäden gebildet. Offensichtlich handelt es sich bei dieser Form der Knochenablagerung um ein osteoinduktives Phänomen, dass zu einer Umwandlung von mesenchymalen Stammzellen in osteogenetische Zellen führt. Fibronektin, ein wichtiger Bestandteil von Fibrin, gilt als kristallisationskernbildendes Protein in der frühen Kalzifizierung. Die durch Fibrin angelockten Fibroblasten produzieren extrazelluläre Kollagenmatrix, welche sich überall zwischen den Granula verteilt. Die Kollagenfasern dienen als Gerüst für einwandernde Knochenzellen und führen so zu einer tiefen Kolonisation des Implantates mit Knochengewebe. Der prozentuale Anteil an neu gebildetem Knochen war zwar in beiden Gruppen letztlich gleich, allerdings war es in der Fibrin Gruppe zu einem weitaus besseren Wachstum von Knochen in die Tiefe des Implantats gekommen. Offensichtlich verbesserte Fibrin das osteoinduktive Verhalten der Keramik⁷³. Ein Mangel an kontrollierten Studien und die Verwendung von kommerziell erhältlichen Fibrinprodukten mit unterschiedlichen Thrombinkonzentrationen (4-1000 U/ml) werden als Ursachen für die widersprüchlichen Ergebnisse der verschiedenen Arbeiten angesehen. Thrombin interagiert mit verschiedenen Zellen des Organismus. An Osteoblasten wirkt es über Protease aktivierte Rezeptoren (PAR) und führt zu einer Proliferation von Osteoblasten und Osteoklasten und zu einer Hemmung von ALP. Zu hohe Thrombinkonzentrationen führen zur Ausbildung eines sehr dichten Fibrinnetzes, welches das Einwachsen von Knochenzellen in das Transplantat verhindert⁷². Bluteau et al untersuchte die Auswirkungen von Tissucol® und von unterschiedlichen Thrombinkonzentrationen auf das Verhalten von Osteoblasten in vitro und die Auswirkungen von Thrombin auf ihr angiogenetisches Potential. Mäuseosteoblasten wurden auf biphasischen Kalziumphosphatkeramiken, die mit Bestandteilen von Tissucol® beschichtet waren kultiviert. Es konnte gezeigt werden, dass Tissucol® zu einer Erhöhung von alkalischer Phosphatase und Osteokalzin führt, beides Marker für die Osteoblastendifferenzierung. Thrombinkonzentrationen über 5U/ml führten zu einer Verminderung von alkalischer Phosphatase und von Parathormonrezeptoren und zu einer Erhöhung von Osteoprotegerin. Niedrige Thrombinkonzentrationen führten zu einer Stimulierung der Expression von ALP und über eine vermehrte Expression des vaskuloendothelialen Wachstumsfaktors zu einer Erhöhung des angiogenetischen Potentials der Osteoblasten. Wie bereits erwähnt stellt die Angiogenese einen unabdingbaren Vorgang im Rahmen der Knochenheilung dar. Die Resultate der Studie von Bluteau weisen sehr stark darauf hin, dass sich Fibrinprodukte mit niedrigen

Thrombinkonzentrationen ($<5\text{U/ml}$) äusserst positiv auf die Knochenheilung und auf die Aktivität der Osteoblasten auswirken⁶⁹. Le Nihouannen et al evaluierte in seiner Studie die Auswirkungen von unterschiedlichen Thrombinkonzentrationen auf die Eigenschaften von MBCP Granula. Niedrige Thrombinkonzentrationen führten zu einer höheren Porosität des Fibrinpfropfs, was das Eindringen von Flüssigkeiten und Zellen fördert. Ausserdem konnten nadelförmige Kristalle zwischen der Fibrinschicht und den Kalziumphosphatpartikeln festgestellt werden. Man nimmt an, dass Fibronektin als Kristallisationskern zur Ausfällung von Apatiten führt, die sich an die Fibrinfäden anlagern und zur Osteokonduktion führen. Fibrin scheint die Knochenheilungskapazität von MBCP zu verbessern⁷⁴.

2.2.4 Fibrinprodukte als Trägersubstanz für Knochenersatzstoffe und als lokales „Delivery System“

Biomaterialien werden häufig in Form von Granula oder Blöcken verwendet. In dieser Gestalt sind sie schwierig in der Handhabung und können sich unter Umständen dem Knochendefekt nicht adäquat anpassen. Durch die Zugabe von Fibrinprodukten werden Biomaterialien leichter formbar, passen sich besser der Knochenoberfläche an und werden durch die adhäsiven Eigenschaften von Fibrin vor einer Deplatzierung bewahrt. Durch die Verbesserung der mechanischen Stabilität der Biomaterialien führt Fibrin sekundär zu einer vermehrten Knochenbildung. Das dreidimensionale Fibrinnetz verzweigt sich in den Poren der Keramiken und fördert durch Wachstumsfaktoren und angiogenetische Faktoren die Vaskularisation des Implantates und das Einwandern von Zellen³¹. Die Verbesserung der mechanischen Stabilität erweist sich speziell in der Wirbelsäulenchirurgie als vorteilhaft, da es bei alleiniger Anwendung von autologem Knochen oder von Knochenersatzstoffen durch Instabilität zu einer Kompression des Knochenmarks oder Irritation des umliegenden Nervengewebes kommen kann, was in der Folge neurologische Ausfallserscheinungen provoziert⁷⁸. Bei Knochendefekten führt eine Bewegung des Implantates zur Ausbildung von nichtmineralisiertem Bindegewebe im Frakturspalt und damit zu einer Pseudoarthrose⁷⁹. Neben dem Einsatz als Trägersubstanz und biologisches Adhäsiv eignen sich Fibrinpräparate auch als Vehikel für die lokale Abgabe verschiedenster Substanzen und Zellen. Es ist gelungen Wachstumsfaktoren (BMPs, bFGF, PDGF, NGF etc.), Pharmazeutika, Zellen (MSCs, Knorpelvorläuferzellen, etc.), Hormone (PTH) und virale Vektoren (AAV) in Fibrinmatrices zu integrieren und ihre Abgabe zu steuern. Durch die Bindung an die

Matrix und die kontrollierte Abgabe werden geringere Mengen der oft kostspieligen Substanzen verbraucht, systemische Nebenwirkungen verhindert und gleichzeitig die positiven Auswirkungen von Fibrin auf die Heilung genutzt^{71, 80-91}.

2.3 PTH

2.3.1 Allgemeine Physiologie

Parathormon oder Parathyrin ist ein 84 Aminosäuren langes Peptidhormon und wird in den Nebenschilddrüsen gebildet. Gemeinsam mit seinem Gegenspieler Kalzitinin und der biologisch aktiven Form des Vitamin D3 regelt es den Kalziumhaushalt des Körpers. Das intakte Polypeptid wird vor allem in der Leber, aber auch in der Niere und im Knochen gespalten, wobei neben den aktiven N-terminalen Fragmenten (1-34) auch biologisch inaktive C-terminale Fragmente (35-84) und mittelregionale Fragmente entstehen. Das N-terminale Fragment trägt die Region mit der biologischen Aktivität. Bei Hypokalzämie wird vermehrt PTH ausgeschüttet. PTH führt indirekt zu einer Reifung und Aktivierung von Osteoklasten und damit zu einer Kalzium – Phosphatmobilisierung aus dem Knochengewebe. Während Osteoklasten keine PTH-Rezeptoren besitzen, wurde auf Osteoblasten eine große Anzahl gefunden. Der Stimulus für die Knochenresorption erfolgt also indirekt durch ein Signal, dass die Osteoblasten nach Bindung von PTH an die Osteoklasten vermitteln. Bei Bindung von Parathormon an den Rezeptoren wird der Osteoklasten – differenzierende Faktor (ODF) in die Plasmamembran der Osteoblasten eingebaut. ODF interagiert mit RANK (receptor activator of nuclear factor κ B, Membranrezeptor), der von Osteoklasten exponiert wird und bei Aktivierung die Osteoklastogenese fördert. In der Niere hemmt PTH die Phosphatrückresorption, fördert die Kalziumrückresorption und bewirkt die Bildung von Vitamin D3. Dieses steigert die Kalziumrückresorption im Darm. Unter Hypoparathyreoidismus versteht man die Konsequenzen einer PTH Defizienz. Dieser liegt entweder eine Verminderung der Bildung von PTH (nach Exzision der Nebenschilddrüse oder idiopathisch) oder eine Hormonresistenz der Zellen (Pseudohypoparathyreoidismus) zugrunde. Eine primäre Niereninsuffizienz (Morbus Addison) kann ebenfalls Ursache dieser Erkrankung sein. Dabei kommt es durch Schädigung der Nebennierenrinde zu einer verminderten Produktion von Kortison. Als Therapie werden lang andauernde hohe Kortisongaben eingesetzt. Kortison fördert den Abbau von Kalzium aus dem Knochen, hemmt die Aufnahme aus dem Darm und

fördert die Ausscheidung von Kalzium über die Niere. Folgen einer PTH Defizienz sind Hypokalzämie und in der Folge Tetanien. Hyperparathyreoidismus ist die pathologische Erhöhung des PTH Gehaltes. In diesen Fällen liegt eine Vergrößerung der Nebenschilddrüse vor. Die Ursache sind meist Tumore. Folgen sind Osteomalazie, Demineralisierung der Knochen, Frakturen und Nierensteine⁹².

2.3.2 Die paradoxe Wirkung von PTH auf den Knochen

Osteoklasten bauen den Knochen durch Resorption ab, Osteoblasten bauen den Knochen aus Matrix, die dann mineralisiert wird, wieder auf. Auf diese Weise wird die Knochenmasse lokal erhalten. Die Umbauvorgänge werden durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Mechanische Beanspruchung, die Wirkung von Steroiden (Östrogen), Wachstumsfaktoren, genetische Komponenten und das ZNS (Leptin) haben beispielsweise großen Einfluss auf Knochenumbauvorgänge⁹³. PTH und sein Gegenspieler Kalzitinin nehmen aber mit Sicherheit die zentrale Rolle im Umbau der Knochenmasse ein. Aus der Reaktion von PTH auf eine Hypokalzämie und aus dem Krankheitsbild des Hyperparathyreoidismus lässt sich eine katabole Wirkung von PTH auf den Knochen klar ableiten. Es klingt daher paradox, dass gerade PTH ein Wirkstoff sein soll, der auch für den Knochenaufbau genutzt werden kann. Viele Studien haben gezeigt, dass PTH, in Abhängigkeit von der Art der Administration, die Knochenbildung stimulieren oder hemmen und die Knochenmasse vermindern oder vermehren kann. Eine kontinuierliche Erhöhung der Serumkonzentration von PTH wirkt katabol auf den Knochen und führt zu einer gesteigerten Knochenresorption. Bei intermittierenden, kurzen Erhöhungen von PTH wirkt es aber anabol und führt daher zu einer Zunahme der Knochenmasse. Der genaue Mechanismus der anabolen Wirkung von PTH auf den Knochen ist nach wie vor nicht ganz geklärt und wird kontrovers diskutiert. Es wäre extrem wichtig den zugrunde liegenden Mechanismus zu verstehen, da das proliferative Potential der Zielzellen entscheidend für die Effizienz einer PTH Therapie bei osteopenischen Menschen ist. In den unterschiedlichen Studien werden vermehrte Rekrutierung, Proliferation, Differenzierung oder verminderte Apoptose von Osteoblasten, sowie Reaktivierung von Knochenbelegzellen („lining cells“) als Ursache für die anabole Wirkung von PTH diskutiert. In manchen Studien wird auch die Meinung vertreten, dass alle Wege gemeinsam zu einer Stimulation des Knochenwachstums führen. Reife Zellen mit PTH-Rezeptoren produzieren autokrin (selbststimulierend) und parakrin (umgebungsstimulierend) Faktoren, die wiederum zu

einer Vermehrung der aktiven Progenitorzellen führen. Diese Faktoren agieren somit als „messenger“ welche die PTH-Botschaft zu den weit entfernten rezeptorlosen Osteoprogenitorzellen transportieren. PTH bewirkt, dass Osteoblasten aller Entwicklungsstufen länger leben, indem es die Selbstzerstörung verhindert. Außerdem bewirkt PTH, dass in endostalen, trabekulären und osteonalen Oberflächen ruhende „lining cells“ (Knochenbelegzellen) ihren Ruhezustand verlassen und zu aktiv arbeitenden Osteoblasten werden⁹⁴. Pettway et al untersuchte die Auswirkung von PTH auf osteogenetische Zellen, die sich in verschiedenen Differenzierungsstadien befanden. Knochenstücke wurden aus Knochenmarkstromazellen hergestellt und in immunsupprimierte Mäuse implantiert. Die Tiere wurden 3 Wochen mit PTH oder einem Placebo behandelt. In der PTH - Gruppe konnte mittels Biolumineszenz eine erhöhte Zellproliferation und damit ein anaboler Effekt auf das Knochenimplantat nachgewiesen werden⁹⁵. Die angeblich antiapoptotische Wirkung von PTH auf Osteoblasten wurde von Jilka et al im Mäusemodell bei täglicher subkutaner Injektion evaluiert. Es wurden sowohl Gesunde, als auch osteopenische Tiere verwendet. Die TUNEL-Methode wurde für die Darstellung von Zellkernen apoptotischer Zellen in vivo genutzt und zeigte, dass der Anteil an apoptotischen Zellen bei PTH behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich vermindert war. In der PTH Gruppe konnte auch eine erhöhte Osteozytendichte nachgewiesen werden, was zum Einen für einen verminderten Zelluntergang der Osteoblasten und zum Anderen für eine verminderte Apoptose der Osteozyten sprechen kann. Im Rahmen der in vitro Tests wurden Primärkulturen von Osteoblasten und Osteozyten angelegt denen ein Kortikoid zugegeben wurde. Wurde den Zellkulturen zusätzlich PTH beigemischt, konnte die apoptotische Wirkung des Kortikoids eingeschränkt werden⁹⁶. Bezugnehmend auf die Annahmen PTH könnte Knochenbelegzellen reaktivieren versuchte Onyia et al Gene im Rattenmodell zu detektieren, die bei der intermittierenden und kontinuierlichen PTH Administration exprimiert werden. Für diesen Zweck wurde RNA aus den Femura von Ratten genutzt, die 7 Tagen lang entweder intermittierend oder kontinuierlich mit PTH behandelt wurden. Mittels DNA - Microarrays konnte gezeigt werden, dass beide Applikationsformen die Expression von Genen unterdrücken, die mit Proliferation assoziiert werden. Dieses Ergebnis unterstützt die These, dass PTH nicht zu einer Proliferation von Osteoblasten führt, sondern die Aktivität bereits vorhandener Knochenbelegzellen verändert⁹⁷. Dobnig et al testete im Rattenmodell die Hypothese, dass PTH die Knochenmasse durch eine Rekrutierung von Osteoblasten aus

Osteoprogenitorzellen im Knochenmark steigert. Aus diesem Grund wurden gesunde Ratten und ovariectomierte Tiere während der PTH Therapie mit radioaktiv markiertem Thymidin infundiert. Thymidin bindet an neu synthetisierte DNA, wodurch neu gebildete Osteoblasten autoradiographisch nachgewiesen werden können. Obwohl sich die knochenbildende Oberfläche massiv vergrößert hatte waren unter der Vielzahl der vorhandenen Osteoblasten nur wenig Thymidinmarkierte zu verzeichnen. Die Mitoserate der Osteoprogenitorzellen in der mit PTH behandelten Gruppe war vergleichbar mit der Teilungsrate in der Kontrollgruppe. Dies unterstützt ebenfalls die Annahme, dass sich Knochenbelegzellen unter der Wirkung von PTH in Osteoblasten rückdifferenzieren⁹⁸. Knochenbelegzellen haben so gut wie kein Proliferationspotential und der Knochenumfang bei osteopenischen Menschen ist wesentlich geringer als bei Gesunden. Das würde für die PTH-Therapie der an Osteoporose erkrankten Menschen bedeuten, dass die Anzahl der Knochenbelegzellen und damit die Anzahl der sich daraus differenzierenden Osteoblasten und die von ihnen gebildete Knochenmasse geringer wäre als bei Gesunden. Diese Annahme konnte in der Studie von Onyia et al durchaus belegt werden, da die einzelnen Knocheneinheiten ovariectomierter Tiere genau gleich auf PTH reagierten wie die gesunder Tiere, aber insgesamt bei ovariectomierten Tieren weniger Knochen neu gebildet wurde⁹⁷. Die Ursache der katabolen Wirkung bei kontinuierlicher Applikation von PTH ist ebenfalls noch nicht ganz geklärt. Manche Studien gehen davon aus, dass eine ständig erhöhte Konzentration von PTH mit einer gesteigerten Expression des Nuclear Factor-kappa B Activator Liganden (RANKL) einhergeht und als Folge die Osteoklastogenese forciert wird.

2.3.3 Systemische Anwendung von PTH₁₋₃₄

PTH wird seit 1970 in der Humanmedizin zur Therapie von Osteoporose eingesetzt. Die Erkrankung ist charakterisiert durch eine niedrige Knochenmasse und eine schlechte Trabekelarchitektur. Knochenbrüche sind eine häufige Folge. Von der postmenopausalen Osteoporose, die häufigste primäre Osteoporoseform, sind 30 % der 50 – 70 jährigen Frauen betroffen. Östrogen fördert die Speicherung von Kalzium im Knochen. Dadurch kann im Fall einer Schwangerschaft oder während der Stillzeit genügend Kalzium mobilisiert werden. In der Menopause sinkt Östrogen und damit die Kalziumeinlagerung in den Knochen. Für therapeutische Zwecke wird am häufigsten Teriparatid [rhPTH(1-34)] eingesetzt, ein humanes rekombinant hergestelltes PTH-Analogon, welches in der Struktur mit den Aminosäuren 1-34 des aktiven Fragments

des menschlichen Parathormons identisch ist und deshalb dieselben Effekte wie dieses induziert. PTH muss streng von antiresorptiven Wirkstoffen (Östrogen, Kalzitinin) unterschieden werden. PTH baut Knochen auf und Antiresorptiva verhindern den Knochenabbau. Eine Kombination der Wirkstoffe ist jedoch in der Therapie von Osteoporose durchaus möglich. PTH in niedriger Dosierung hat sowohl auf die Spongiosa als auch auf den Kortex einen anabolen Effekt. Knochen wird an der endostalen und periostalen Knochenoberfläche zugebildet. Es kommt zu einer Verdickung des Kortex und zu einer Erhöhung der Dichte der Mineralien im Knochen und der Trabekelverbindungen. Die Gefahr erneuter Frakturen sinkt. Die Anwendungsgebiete der PTH Therapie haben sich in den letzten Jahren in der Humanmedizin auf die Therapie der idiopathischen oder hypogonadalen Osteoporose bei Männern, der SO (severe osteoporosis) und der Vermeidung damit einhergehender Frakturen erweitert. In zahlreichen Studien konnten die präventiven Eigenschaften von PTH im Bezug auf Wirbel-, Hüft- und Rippenfrakturen, sowie Frakturen der langen Röhrenknochen gezeigt werden⁹⁹⁻¹¹⁰. Neue Perspektiven auf dem Gebiet der Einsatzmöglichkeiten der PTH Therapie ergeben sich aus den laufenden Tierstudien. Beispielsweise ist noch sehr wenig über die Heilungskapazität von PTH bei der Behandlung von Frakturen und Osteotomien bekannt. Bei der systemisch intermittierenden Anwendung von PTH₁₋₃₄ in Tibiaosteotomie- und Frakturmodellen konnten sowohl positive Auswirkungen von PTH auf die Knochenzubildung und Knochenheilung als auch auf die Chondrogenese nachgewiesen werden¹¹¹⁻¹¹³. Es konnte auch gezeigt werden, dass die Fixierung von orthopädischen Implantaten im Knochen durch die systemische Wirkung von PTH positiv beeinflusst wird¹¹⁴. Auf dem Gebiet der Wirbelsäulenchirurgie wurden in Tierversuchen mit autologem Knochen vergleichbare oder sogar bessere Fusionsergebnisse erzielt. Berichten zufolge wurde die gewünschte Arthrodesis unter der systemischen Wirkung von PTH schneller erreicht und die Fusionsmasse erschien grösser und knochendichter als bei autologem Knochen^{115, 116}. Eine weitere Zukunftsperspektive für den Einsatz von PTH in der Humanmedizin ist die Möglichkeit mit PTH Knochenmarkszellen zu vermehren und danach in die Knochenmarkhöhlen von Krebspatienten zu implantieren, die aufgrund der negativen Auswirkungen von Chemotherapeutika oder der Bestrahlungstherapie „geleert“ wurden¹¹⁷.

2.3.4 Lokale Anwendung von PTH₁₋₃₄

In neueren Experimenten konnte gezeigt werden, dass PTH auch bei lokaler Anwendung zu einer Knochenneubildung führt. Die Vorteile einer lokalen gegenüber einer systemischen Therapie liegen darin, dass das Heilungspotential des Präparates durch die lokale Applikation maximiert werden kann, dass geringere PTH Mengen verbraucht werden und dass mit keinen systemischen Nebenwirkungen zu rechnen ist. Bislang gibt es noch wenige Publikationen und die verwendeten Präparate werden hauptsächlich im Tierversuch eingesetzt (Versuchsreihe im eigenen Labor). Für die lokale Anwendung von PTH in einer Fibrinmatrix wurde das einzelsträngige PTH₁₋₃₄ Molekül um 12 Aminosäuren verlängert. Diese Sequenz wird als „TG - hook“ bezeichnet und beinhaltet 2 physiologische Bindungsstellen. Die erste Bindungsstelle enthält eine Substrat-Sequenz für das Koagulationsenzym Faktor XIIIa, welches PTH₁₋₃₄ während der Koagulation kovalent an Fibrin bindet. Die zweite Bindungsstelle beinhaltet eine Plasmin-Substratsequenz, welche die proteolytische Freisetzung von PTH ermöglicht. Die Funktionalität des Konstrukts wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* getestet. Im Rahmen der *in vitro* Tests wurde die Aktivität der Transglutaminase Sequenz evaluiert, die Funktion der Degradierungsdomäne untersucht und Freisetzung von PTH₁₋₃₄ gemessen. *In vivo* Versuche wurden anhand eines Drillhole – Modells am Schaf durchgeführt. Das Ausmass der Knochenbildung wurde mikrocomputertomographisch und histologisch untersucht. *In vitro* konnte sowohl die kovalente Bindung von PTH₁₋₃₄ an die Fibrinmatrix, als auch die Freisetzung desselben durch proteolytische Spaltung bestätigt werden. *In vivo* konnte ein starkes Heilungspotential des Produktes festgestellt werden¹¹⁸. In einer Publikation von Fuerst et al wurde die Anwendung von kovalent in Fibrinmatrix gebundenes PTH₁₋₃₄ erstmals an einem klinischen Fall beschrieben. Eine subchondrale Knochenzyste mit Gelenkskommunikation im lateralen Kondylus des linken Fesselbeins eines Warmblutfohlens wurde nach klassischer chirurgischer Behandlung über das dabei entstandene Bohrloch mit Fibringel und darin gebundenem PTH₁₋₃₄ gefüllt. Nach 8 Monaten präsentierte sich das Fohlen lahmheitsfrei und der zystische Defekt konnte röntgenologisch nicht mehr nachgewiesen werden. Verglichen mit bisher eingesetzten Therapiemethoden konnte die Heilung unter Anwendung von PTH verbessert und forciert werden¹¹⁹. Gute Erfolge wurden auch bei der Integration von PTH₁₋₃₄ in Kollagenmatrizes erzielt. Plasmid-DNA wurde zu diesem Zweck in

Kollagenschwämme eingebaut (Gene Activated Matrix-Technologie, GAM). Ein kommerziell erhältliches, in ein Plasmid verpacktes, Vektorrückrad und ein ebenfalls in ein Plasmid verpacktes hPTH₁₋₃₄ DNA Fragment wurden verwendet. Beide wurden separat enzymatisch gespalten und danach ligiert. Anschliessend wurde der fertige, mit dem therapeutischen Gen beladene Vektor in die Kollagenmatrix eingebaut. Plasmid DNA ist ein hochmolekulares Polyanion, das unmöglich durch die Kollagenmatrix diffundieren kann. Die Matrix hält die DNA solange in situ bis endogene Fibroblasten einwandern. Nach der Transfektion kommt es zu einer Expression der Plasmid DNA durch die Fibroblasten und folglich zu einer Ausschüttung der therapeutischen Proteine¹²⁰⁻¹²². PTH₁₋₃₄ wurde auch erfolgreich in synthetisch und natürlich hergestellten Hydrogelen verwendet. Hydrogele sind dreidimensionale, hydrophile, polymere Netzwerke, die fähig sind sehr grosse Mengen an Flüssigkeiten zu binden. Durch die aufgenommenen Flüssigkeiten vergrössern sich die Poren der Hydrogele und Makromoleküle können aus der Matrix entweichen. Die Porengrösse bestimmt dabei das Ausmass der Freisetzung¹²³. In verschiedenen Tiermodellen konnten bei der Anwendung von Hydrogelen in Kombination mit PTH₁₋₃₄ sehr positive Auswirkungen auf die Knochenbildung verzeichnet werden. Die Ergebnisse waren durchaus mit autologem Knochen vergleichbar. Ein Nachteil der Kombination von Hydrogelen und PTH₁₋₃₄ ist, dass PTH nicht intermittierend abgegeben wird^{124, 125}. Aus diesem Grund wurden Systeme entwickelt, die Hydrogele mit Isolierschichten enthalten, die eine zu schnelle Abgabe des Peptids verhindern¹²⁶. Durch die Anwendung von mehrschichtigen Systemen können auch mehrere verschiedene Biomoleküle alternierend aus der Matrix freigesetzt werden. So gelang es beispielsweise Jeon et al ein Polymersystem zu konstruieren, dass durch die abwechselnden Lagen verschiedener Mikrosphären in 10 Schichten aufgebaut war. Über einen Zeitraum von 2 Wochen konnten für 3 verschiedene Biomoleküle (PTH, antimikrobiell wirkendes Polypeptid Cecropin B, Cholesterin-Synthese Hemmer Simvastatin) 5 individuelle Freisetzungsspeaks verzeichnet werden¹²⁷.

2.4 Erkrankungen der Lendenwirbelsäule

Chronische Schmerzen im Bereich der LWS stellen bei unter 45-Jährigen die Hauptursache für eine vorzeitige Pensionierung dar. Degenerative Wirbelsäulenerkrankungen können isoliert oder gemeinsam auftreten und betreffen

hauptsächlich die Lendenwirbelsäule. Zu ihnen zählen die Spinalkanalstenose, die Spondylose (OCD), das Facettensyndrom (Spondylarthrose), und die degenerative Spondylolisthesis (Wirbelkörpergleiten). Der Verschleiss der Bandscheiben beginnt bereits früh im Leben eines Menschen und führt irgendwann zu einer Bandscheibenvorwölbung oder zum Bandscheibenvorfall. Durch zunehmenden Wasserverlust der Bandscheiben kommt es zu einer Höhenabnahme des Zwischenwirbelkörperabschnittes (OCD). Die Folgen sind eine Überbelastung der kleinen Wirbelgelenke, eine Fehlfunktion der Wirbelsäulenbänder und eine sich schleichend entwickelnde Instabilität. Der Körper versucht dieser Instabilität durch Zubildung knöcherner Strukturen (Exostosen, Osteophyten) an den Wirbelkörper entgegenzuwirken. Dadurch kann sich bei weit fortgeschrittener Erkrankung auch eine Verkrümmung der Wirbelsäule entwickeln (degenerative Skoliose). Die veränderte Wirbelsäulenstatik ändert auch die Ursprungs- und Ansatzpunkte von Bändern und Muskeln. Diese werden pathologisch verkürzt oder gedehnt, was zu schmerzhaften Muskelverhärtungen führt. Durch die inkongruente Lage der Wirbelkörpergelenke zueinander kommt es zu einem vorzeitigen Knorpelabrieb der Gelenkpartner. Dies führt zu Gelenkentzündung, Kapselschwellung und –verdickung. Das Gesamtbild der Wirbelgelenkarthrose (Spondylarthrose) ist entstanden. Eine Folge der Höhenminderung der Bandscheiben und der Lockerung von Muskeln und Bändern ist das Wirbelgleiten (Spondylolisthesis). Dieses Krankheitsbild tritt hauptsächlich zwischen L4 und L5 auf, wobei der 5. Lendenwirbel nach vorne in den Bauchraum gleitet. Instabilitätsbedingte Verschiebungen der Wirbelkörper, Verdickungen der Wirbelgelenkstrukturen, knöcherne Wirbelkanalanbauten, Bandscheibenvorwölbungen und Verdickungen der Wirbelbänder können schliesslich zu einer beträchtlichen Enge des Wirbelkanals führen (Spinalkanalstenose) und das Rückenmark selbst oder die abgehenden Nervenwurzeln bedrängen. Neben der degenerativen Form der Spondylolisthesis existiert auch noch eine jugendliche Form. Bei dieser kommt es durch eine Unterbrechung des Wirbelkörperbogens (Spondylolyse) zu einer Instabilität der Wirbelkörper untereinander. Die Diagnose von Lendenwirbelsäulenerkrankungen stützt sich auf Vorbericht, Röntgen, MRI und CT Untersuchungen¹.

2.5 Chirurgische Therapiemöglichkeiten und Outcome unterschiedlicher Fusionsmethoden

Ziel einer chirurgischen Therapie ist die Ankylose der betroffenen Segmente. Dadurch werden Bewegungen zwischen den betroffenen Wirbeln und der damit verbundene Schmerz kontrolliert. Der chirurgische Eingriff steht an letzter Stelle der Therapiekaskade und die Wahl der Fusionsmethode ist abhängig von der vorliegenden Erkrankung. Zum Teil müssen mehrere Segmente gleichzeitig behandelt werden. Die Wirbelkörperfusion ist beispielsweise ein Verfahren, dass bei schmerzhaften Bandscheibenerkrankungen indiziert ist. Die veränderte Bandscheibe wird dabei entweder über eine Laparotomie und Thorakotomie oder über einen dorsalen Zugang entnommen. Die Wirbelkörper werden nach Entfernung der Bandscheibe entweder nur mittels autologem Knochen oder Biomaterial oder mit einer Kombination aus Cage und autologem Knochen oder Biomaterial fusioniert. Cages sind künstliche Bandscheiben, die mit autologem Knochenmaterial oder Alternativen dazu befüllt werden können und deren Oberflächen Löcher aufweisen, in die Knochen vom Wirbelkörper aus einwachsen kann. Die Bandscheibenprothese verhindert das Kollabieren des Intervertebralraumes, die Einengung des Foramens und eine Kompression der Nervenwurzeln¹²⁸. Der dorsale Zugang ist minimalinvasiver, muss aber oft zur Verbesserung der Sicht auf die Nervenwurzeln und zur Erleichterung der Manipulation im Intervertebralraum mit einer Laminektomie und manchmal auch mit einer Entfernung der Facettengelenke kombiniert werden. Bei beiden Wirbelkörperfusionsmethoden können zusätzlich zur Verbesserung der Stabilität der Segmente instrumentierte oder uninstrumentierte posteriore Fusionsmethoden zur Anwendung kommen, wobei zu diesem Zweck bei ventralem Zugang ein zusätzlicher dorsaler Zugang gewählt werden muss, der natürlich die Operationszeit verlängert und das perioperative Risiko erhöht. Zu den instrumentierten posterioren Methoden zählen die posterolaterale lumbale Fusion mit Pedikelschraubensystem und die Facettengelenksfusion mit quer durchs Gelenk verlaufender Schraube. Die uninstrumentierten posterioren Fusionsmethoden sind durch den Verzicht auf Implantate gekennzeichnet und lassen sich in die posteriore, die posterolaterale und die Facettengelenksfusion einteilen. Bei der posterioren Fusion werden die Bogenplatten und die Dornfortsätze, bei der posterolateralen Fusion die Transversalfortsätze und bei der Facettengelenksfusion die Facettengelenke dekortiziert und mittels autologem

Knochen oder Knochenersatzstoffen fusioniert. Posteriore Methoden kommen als eigenständige Verfahren beispielsweise bei der Behandlung von Spondylolisthesis oder von osteoarthritischen Veränderungen der Lendenwirbelsäule zum Einsatz. Die Anwendung von posterioren instrumentierten Verfahren bei degenerativen Bandscheibenerkrankungen wird kontrovers diskutiert. Nach der Meinung vieler Autoren sind instrumentierte posteriore Fusionsmethoden bei Erkrankungen von Bandscheiben kontraindiziert, weil eine vollständige Immobilisierung des betroffenen Segments nicht möglich ist und axiale Bewegungen der Bandscheibe zu einem Erhalt der Schmerzen, die vom Annulus ausgehen, führen². Parker et al zeigte beispielsweise in seiner Studie, dass die posterolaterale Fusion bei durch Bandscheibenschäden/-vorfall verursachten Schmerzen bei 39% von 23 Patienten ausgezeichnete Ergebnisse, bei 13% gute und bei 48% schlechte Ergebnisse lieferte¹²⁹. Es ist sehr schwierig die Resultate der einzelnen Fusionsmethoden untereinander zu vergleichen, da die Diagnoseverfahren und Beurteilungskriterien in den vorhandenen Studien sehr unterschiedlich sind. Sowohl im Tierversuch als auch bei klinischer Anwendung werden für die verschiedenen Methoden teils unterschiedliche Zeiträume bis zur endgültigen Fusion, teils stark voneinander abweichende Fusionsraten beschrieben. Bei Anwendung der instrumentierten posterolateralen Fusion mit Pedikelschraubensystem wurden beispielsweise im Schafmodell exzellente Fusionsraten schon nach 5-6 Monaten, aber teilweise auch erst nach einem Jahr beschrieben¹³⁰⁻¹³³. Im Vergleich dazu evaluierte Sandhu et al die anteriore Wirbelkörperfusion in Kombination mit autologem Knochen im Schafmodell und musste nach 6 Monaten feststellen, dass nur bei 2 der 6 Tiere eine zufriedenstellende Fusion erzielt wurde¹³⁴. In der Humanmedizin sind bei Anwendung von posteriorer und anteriorer Wirbelkörperfusion in Kombination mit autologem Knochen nach einem Jahr Fusionsraten von über 90 % beschrieben¹²⁸. Christensen et al evaluierte die einzelnen Verfahren in einer Langzeitstudie von 5-13 Jahren genauer und ermittelte bei der Anwendung der anterioren Wirbelkörperfusion mit autologem Knochengewebe eine durchschnittliche Fusionsrate von 66%. Die uninstrumentierte und instrumentierte posterolaterale Fusion führte in Kombination mit autologem Knochen zu annähernd gleichen Fusionsraten (72-76%). Greenough et al konnte bei kürzerem follow-up bei Anwendung der posterolateralen instrumentierten Fusion in Kombination mit autologem Knochen Fusionsraten von 82% und bei anteriorer Fusion noch deutlich bessere Ergebnisse feststellen¹³⁵. Die besten Fusionsraten wurden bislang bei Anwendung der zirkumferentiellen Fusion erzielt (92%). Bei dieser Operationsmethode

handelt es sich um eine Kombination aus anteriorer und posteriorer Wirbelkörperfusion mit zusätzlicher posterolateraler Stabilisierung. Nachteile dieser Technik sind eine Verlängerung der OP Zeit und eine Erhöhung der perioperativen Komplikationen^{2, 136}. Christensen et al verglich in seiner Studie die posterolaterale Fusion mit der zirkumferentiellen Fusion (ALIF) punkto Fusionsraten, Komplikationen, Herstellung lumbaler Lordose und Funktionalität. 148 Patienten mit chronischen Rückenschmerzen wurden willkürlich auf beide OP-Methoden verteilt. In beiden Gruppen kam es alle Parameter betreffend zu einer Verbesserung, wobei die zirkumferentielle Methode deutlich zu besseren Ergebnissen führte als die Posterolaterale. Eine sagittale Lordose konnte auch nur mit der zirkumferentiellen Operation hergestellt werden¹³⁷.

2.6 Posterolaterale lumbale Fusion

2.6.1 Instrumentierte und uninstrumentierte posterolaterale lumbale Fusion

Die posterolaterale Fusion kann indikationsabhängig instrumentiert oder uninstrumentiert durchgeführt werden. Die uninstrumentierte Methode wurde erstmals von Hibbs 1911 durchgeführt und ist indiziert, wenn keine Deformation oder Instabilität der Wirbel vorliegt oder bei Patienten die mit der Anbringung eines Korsettes nach der Operation einverstanden sind. Indikationen für eine instrumentierte posterolaterale Fusion sind degenerative Erkrankungen der Zwischenwirbelscheiben und Erkrankungen, die mit Instabilität einhergehen (adulte Skoliose, Spondylolyse, Spondylolisthese). Eine Instabilität liegt vor, wenn der Halteapparat (Bänder, Muskulatur) nicht mehr fähig ist, die Wirbel in ihrer physiologischen Anordnung zu fixieren. Röntgenologisch liegt eine Instabilität vor, wenn die Wirbel mindestens 3-3,5 mm gegeneinander verschoben sind oder wenn der Winkel zwischen 2 Wirbeln eines Segments grösser als 10° ist¹³⁸. Bei beiden Operationstechniken kann zwischen einem medianen oder paramedianen (zwischen M. longissimus und M. multifidus) Zugang gewählt werden. Der Nachteil des ersten Zuganges liegt darin, dass sehr viel Weichteilgewebe präpariert werden muss und damit das Risiko einer Infektion grösser ist. Beim medianen Zugang erfolgt der Hautschnitt oberhalb der Dornfortsätze des gewünschten Segments. Danach wird die paraspinale Muskulatur gemeinsam mit dem Periost stumpf von den Dornfortsätzen und den Bogenplatten präpariert und die Facettengelenke und die Transversalfortsätze dargestellt. Bei der instrumentierten

posterolateralen Fusion wird der dorsale Kortex des Pedikels und der Pedikelkanal eröffnet, die Spongiosa zur Seite geschoben und die Länge des Kanals vermessen. Die Facettengelenke werden aufgefrischt und die Bogenplatten und die Querfortsätze dekortiziert. Danach werden beidseits je 2 Schrauben in den Wirbelkörper eingesetzt. Die Schrauben einer Seite werden jeweils durch einen Stab verbunden. Die Fixierung der Stäbe in den Schraubenköpfen erfolgt entweder durch Hülse und Mutter oder durch aufschraubbare Verschlusskappen. Zur Verbesserung des Fusionsergebnisses werden Knochentransplantate oder Knochenersatzstoffe entweder auf die Querfortsätze oder in die lateralen Rinnen zwischen Stäben und Bogenplatten eingebracht¹³⁹. Bei der nicht instrumentierten posterolateralen Fusion wird auf ein Schraubensystem verzichtet, die Facettengelenke und die Transversalfortsätze dekortiziert und mittels autologem Knochen oder Knochenersatzstoffen fusioniert. Bei beiden Verfahren gilt der Einsatz von autologem Knochen zur Fusion der Transversalfortsätze als „Golden Standard“. Allerdings wird in der Literatur immer wieder von hohen Pseudoarthrose- und Reoperationsraten berichtet. Die Entnahme von autologem Knochen aus der Crista iliaca geht mit einer hohen Morbidität einher. Die Verwendung von lokalem Knochenmaterial als Alternative zur Crista iliaca stellt auch keine Lösung dieses Problems dar, da das vorhandene Knochenvolumen für die posterolaterale Fusion nicht ausreicht. Es wird angenommen, dass die Fusionsergebnisse bei Verwendung von autologem Knochen dosisabhängig sind. Pedikelschraubensysteme wurden erstmals von Roy-Camille et al 1986 beschrieben. Heute sind zahlreiche Pedikelschraubensysteme mit dazu passendem Instrumentarium für unterschiedliche Erkrankungsprozesse in Verwendung (Axon™ System, Pangea System, Click`X Pedikelschraubensystem, USS Universal Spine System, Synthes®). Titan- oder Titanlegierungen verfügen über eine hohe Biokompatibilität, sind weder anfällig auf Korrosion noch auf Ermüdung und sind MRI-kompatibel, weshalb sie bevorzugt verwendet werden. Durch eine verbesserte Schrauben-Knochenverbindung eignen sich Titanschrauben hervorragend bei Patienten, die an Osteoporose leiden und bei älteren Patienten mit eingeschränkter Osteogenese. Pedikelschrauben sind in verschiedenen Ausführungen erhältlich und werden je nach Indikation eingesetzt. Schrauben mit aufklickbarem, polyaxialen Kopf ermöglichen bis zu 25° Angulation und dadurch freien Zugang zum Bandscheibenraum für Dekompression und Zwischenwirbelfusion. Schrauben mit vormontiertem Kopf halten starken Kräften stand und eignen sich sehr gut für degenerative Erkrankungen. Pedikelschrauben mit seitlicher Öffnung erlauben eine gute Adaptation an gebogene

Stäbe und erweisen sich daher in der Korrektur von Skoliose als vorteilhaft. Die meisten heute eingesetzten Schrauben verfügen über ein selbstschneidendes Gewinde und eine stumpfe Spitze für schnelles und sicheres Einbringen. Das Dual-Core Design des Gewindes gewährleistet eine gute Verankerung der Schraube im Knochen. Der Schaft für kortikalen Knochen greift im Pedikel, die Spitze für spongiösen Knochen im Wirbelkörper. Pedikelschrauben, bei denen die Gewindesteigung doppelt so gross ist wie die Gewindeneigung (doppelgängiges Gewinde) können besonders schnell in den Knochen eingebracht werden. Schrauben mit niedrigem Gewinde gelten als äusserst weichteilschonend. Harte Stäbe werden für Frakturen und Deformitäten eingesetzt, Weiche für degenerative Erkrankungen. Vorgebogene Stäbe erübrigen das Anbiegen, vereinfachen die Montage und spiegeln die Krümmung der Wirbelsäule wider¹⁴⁰⁻¹⁴³. Die Vorteile bei der Verwendung eines Pedikelschraubensystems liegen in einer sofortigen Stabilisierung des betroffenen Segments und in der Möglichkeit einer sofortigen Mobilisierung des Patienten postoperativ ohne Korsette. Durch die Ruhigstellung des Segmentes wird eine ideale Grundlage für die gewünschte Ankylose geschaffen¹⁴⁴. Ausserdem können Korrekturen von Deformierungen durch die Stabilisierung individueller Segmente erreicht werden. Ob jedoch bei Verwendung von Pedikelschrauben die physiologische Krümmung der Lendenwirbelsäule nach vorne (Lordose) wieder hergestellt werden kann, wird kontrovers diskutiert. Degenerative Veränderungen benachbarter Segmente und Retrolisthesis (Rückwärtsverschiebung eines Wirbels) oberhalb des fusionierten Segments stellen grosse Probleme bei der Wiederherstellung der physiologischen Lordose dar. Die posterolaterale Fusion ist eine der populärsten chirurgischen Therapievarianten für die Behandlung von degenerativen Wirbelsäulenerkrankungen. Steffen verglich verschiedene anteriore und posteriore Fusionsmethoden untereinander und kam zum Ergebnis, dass die posterolaterale Fusion bei Schafen unter allen Methoden die besten Fusionsraten erzielte¹⁴.

2.6.2 Komplikationen der instrumentierten posterolateralen Fusion

Die häufigste postoperative Komplikation stellen Schmerzen dar. Diese können zum einen von einer Kompression der Nervenwurzeln aufgrund einer Missplatzierung der Schrauben herrühren, zum anderen aber auch durch die Ausbildung einer Pseudoarthrose entstehen. Im ersteren Fall müssen die Schrauben oftmals entfernt werden, was weitere Komplikationen nach sich zieht und eine Schmerzfreiheit nicht garantiert¹⁴⁵. Die ASD (adjacent segment disease) ist eine Spätkomplikation der Fusion,

welche oft ein erneutes chirurgisches Eingreifen notwendig macht. Die Arthrodesen führen zu biomechanischen Veränderungen in den benachbarten Segmenten, welche heute als die Hauptursache der ASD angesehen werden. Dazu zählen ein erhöhter Druck in den Bandscheiben, eine erhöhte Belastung der Facettengelenke und eine erhöhte Mobilität der angrenzenden Segmente. Die röntgenologische Inzidenz liegt bei etwa 52-100%, die klinisch-symptomatische bei 5,2-18,5%. Die symptomatische ASD kommt häufiger bei Patienten mit instrumentierter posterolateraler Fusion als Uninstrumentierter oder bei anderen instrumentierten Methoden¹⁴⁶ vor. Risikofaktoren für die Entwicklung von Veränderungen in angrenzenden Wirbelsegmenten nach einer posterolateralen Fusion stellen ein gehobenes Alter (>50 Jahre), Fusionen, die sich über mehrere Segmente erstrecken und Fusionen von L1-L3 und proximal davon dar¹⁴⁷. Neurologische Ausfallserscheinungen stellen die meist gefürchtete postoperative Komplikation dar. In der Literatur werden sowohl temporäre, als auch persistierende Sensibilitätsstörungen – und Defizite beschrieben. Dabei handelt es sich hauptsächlich um Paresen, wobei der Spinalnerv von L5 am häufigsten betroffen zu sein scheint. Als Ursachen dafür werden intraoperativ Kontusionen und Distractionen von Spinalwurzelfasern, Fehlplatzierung von Schrauben und postoperativ epidurale Nachblutungen und ödematöse Schwellungen der Nervenwurzeln diskutiert. Eine weitere Komplikation stellen Wundinfektionen dar. Schraubenbrüche sind in der Regel klinisch nicht relevant und bedürfen meist keiner operativen Korrektur, ausser sie gehen mit einer inkompletten Fusion oder einer Pseudoarthrose einher¹⁴⁸. Schraubenlockerung aufgrund von Entzündungsreaktionen durch Implantatpartikel, die sich durch Mikrobewegungen gelöst haben, stellt ein häufiger vorkommendes Problem dar. Sowohl Hallab als auch Cunningham zeigten anhand ihrer Tiermodelle, dass Implantatdebris zur Ausbildung einer fibrösen, osteolytischen Zone um die Implantate führt, in der sich Entzündungszellen, Osteoklasten, Sauerstoffradikale und Entzündungsmediatoren anreichern^{149, 150}. Strahlendurchlässige Zonen um die Pedikelschrauben von einem Millimeter oder mehr werden im Rahmen von röntgenologischen Kontrollen immer wieder beobachtet. Bewegungen zwischen Gewinde und Knochen verhindert Knochenneubildung, Revaskularisation und den Umbau von bereits abgestorbenen Knochen. Als Antwort auf die Nekrose und Resorption von umliegenden toten Knochen bildet sich fibröses Gewebe um das Gewinde. Röntgenologisch präsentieren sich diese Veränderungen als aufgehellte Zonen und stellen ein sicheres Anzeichen für die Lockerung der Schrauben dar¹⁵¹. Sehr oft bilden sich diese im Laufe der Zeit zurück.

Aufgehellte Zonen, die 2 Jahre nach der OP immer noch sichtbar sind deuten auf die Gefahr einer Pseudoarthrosenentwicklung hin¹⁵². Sandén untersuchte in seiner Studie den Zusammenhang zwischen den aufgehellten Zonen, dem Drehmoment und dem Widerstand bei der Entnahme der Schrauben. Er stellte dabei eine starke Korrelation zwischen den strahlendurchlässigen Zonen um die Schrauben und der Lockerung dieser Schrauben fest. Manche Schrauben konnten sogar ohne Schraubenzieher entfernt werden. In den meisten Studien wurden Schrauben aus chirurgischem Stahl verwendet. Möglicherweise ist die Inzidenz der Lockerung der Schrauben bei Verwendung von Titan- oder speziell beschichteten Schrauben geringer¹⁵³. Intraoperative Komplikationen wie Duraverletzungen sollten sofort genäht und mit Fibrinkleber versorgt werden, um eine potentielle Infektion oder die Ausbildung einer Liquorfistel zu vermeiden. Starke intraoperative Blutungen sind selten. In der Literatur erwähnt sind Blutungen aus Ästen der Intervertebralarterien im Bereich der Wirbelgelenke und Aortenperforationen. Um derartige Blutungen zu vermeiden sollte die Präparation nicht über das Niveau der Querfortsätze hinaus erfolgen¹⁴⁵. Insgesamt sind in der Literatur 10 Fälle einer Aortenperforation durch Pedikelschrauben beschrieben. Die Perforation wurde in allen Fällen innerhalb von 18 Monaten bemerkt. Teils traten akute Blutungen auf, die sofort intraoperativ behoben werden mussten, teils kam es zur Ausbildung von Pseudonaneurismen, die erst später diagnostiziert wurden. Es wird angenommen, dass Perforationen nicht immer klinisch manifest werden und daher nur wenige Fälle in der Literatur beschrieben sind¹⁵⁴. Eine häufig auftretende Komplikation stellt die Fehlplatzierung von Schrauben mit Durchbrechung der Kortikalis dar, wobei zu erwähnen ist, dass eine Fehlplatzierung eher bei gebohrten, als bei stumpf generierten Schraubenlöchern auftritt. Folgen einer Fehlplatzierung sind Beschädigungen von Spinalnerven, Instabilität und Verletzungen retro-oder intraperitonealer Strukturen. Selten kommt es zur Anwendung der korrekten Operationstechnik im falschen Segment. Um das zu verhindern sollten die betroffenen Wirbel präoperativ markiert werden oder die Operation unter fluoroskopischer Kontrolle durchgeführt werden¹⁴⁵.

2.6.3 Routinediagnostik

Die röntgenologische Untersuchung wird nach wie vor am häufigsten zur Beurteilung des Fusionsgrades herangezogen. Zu erwähnen ist, dass erst 6 bis 9 Monate nach der OP röntgenologisch eine zuverlässige Aussage über den Fusionsgrad getroffen werden kann. Vergleicht man die direkte chirurgische Beurteilung, welche den „Golden

Standard“ unter den diagnostischen Hilfsmitteln darstellt, mit der röntgenologischen Untersuchung, so kommt man auf eine Genauigkeit von etwa 60 – 70%. In einer Studie von Blumenthal und Gill wurde festgestellt, dass der Fusionsgrad röntgenologisch meistens unterbewertet wird. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass sich Osteoid, welches bereits eine funktionelle Verbindung hergestellt hat, sich am Röntgenbild noch strahlendurchlässig darstellt¹⁵⁵. Dynamische Röntgenaufnahmen in Flexion oder Extension sind zumeist wegen der verwendeten Implantate und dem damit eingeschränkten Sichtfeld auch nicht sehr sinnvoll. Die Computertomographie hat gegenüber der röntgenologischen Untersuchung den Vorteil, dass knöcherne Details und damit knöcherne Proliferation besser dargestellt werden können. Allerdings kommt es durch die verwendeten Implantate zu Artefakten (Strahlaufhärtung), die mittels Linearisierungstechnik und Erhöhung der Strahlendosis korrigiert werden können. Bei einer CT Untersuchung ist die Strahlenexposition etwa tausendmal höher als bei einer normalen Röntgenaufnahme¹⁵⁶.

2.6.4 Die Korrelation zwischen erfolgreicher Fusion und klinischer Situation

Laut Literatur verhalten sich die Fusionsraten der instrumentierten und nichtinstrumentierten posterolateralen lumbalen Fusionsmethoden bei Verwendung von autologem Knochen nahezu gleich und liegen bei etwa 66-98%. Allerdings gibt es wenig kontrollierte Studien und die Beurteilungskriterien sind in den einzelnen Studien sehr unterschiedlich. Welches Verfahren im Endeffekt die Fusionsrate und das klinische Resultat betreffend vorteilhafter ist wird teilweise noch immer kontrovers diskutiert. Ein sehr grosser Teil der in der Literatur angegebenen Studien weist aber darauf hin, dass die Anwendung von Implantaten durch die mechanische Stabilisierung gerade in der frühen Heilungsphase von Vorteil ist und dadurch den Grundstein für sehr gute Fusionsergebnisse legt. Kanayama et al zeigte beispielsweise in seiner Schafstudie, dass die instrumentierte posterolaterale Fusion in der frühen postoperativen Phase (8 Wochen post OP) durch eine bessere Stabilisierung histologisch zur Ausbildung von mehr Bälkchenknochen führt als die nicht instrumentierten posterolaterale Fusion. Obwohl zu einem späteren Zeitpunkt (16 Wochen post OP) in beiden Gruppen nahezu die gleichen Fusionsraten zu verzeichnen waren, konnte zweifellos gezeigt werden, dass die gewünschte Arthrodeese durch Anwendung von Implantaten schneller erzielt wurde¹⁵⁷. Sowohl in Tiermodellen als auch in humanmedizinischen Studien konnten im

Zusammenhang mit der instrumentierten posterolateralen Fusion teilweise sehr hohe Fusionsraten erzielt werden. Im Schafmodell wurden durch den Einsatz von Pedikelschrauben vereinzelt sogar Fusionsraten von 100% erreicht^{130, 158}. In einer Humanstudie von Zdeblick et al wurden bei Verwendung von Implantaten Fusionsraten von 95% beschrieben, was ein deutlich besseres Ergebnis darstellt als in der uninstrumentierten Gruppe (65%). Die besseren Fusionsraten korrelierten mit guten klinischen Ergebnissen¹⁵⁹. Auch das häufig publizierte hohe Pseudoarthrosrisiko im Zusammenhang mit beiden Methoden scheint bei Anwendung von Implantaten geringer zu sein¹⁶⁰. Vergleichende Untersuchungen des Gewebes in der Fusionsmasse zeigten, dass der gebildete Knochen bei der instrumentierten posterolateralen Fusion qualitativ hochwertiger ist als bei der nichtinstrumentierten Fusion¹⁶¹. Wie bereits erwähnt wird die vollständige Versteifung des erkrankten Wirbelsegments mit Schmerzfreiheit assoziiert. Berichten in der Literatur zufolge müssen aber hervorragende Fusionsraten nicht unbedingt mit dem klinischen Erfolg korrelieren. Fischgrund et al zeigte beispielsweise in seiner Studie, dass die Anwendung von Pedikelschrauben zwar die Fusionsraten verbesserte, nicht aber das klinische Resultat. Die vor der Operation bereits vorhandenen Schmerzen blieben grösstenteils bestehen¹⁶². In einer Studie von Tokuhashi et al wurden Patienten, die 2 Jahre nach einer posterioren Wirbelkörperfusion bzw. einer posterolateralen Fusion mittels Pedikelschraubensystem und autologem Knochen noch immer keine Fusion aufwiesen weitere 3 Jahre beobachtet. Bei etwa 30% der Patienten kam es mehr als 2 Jahre nach der Operation zu einer vollständigen Arthrode. Die klinischen Resultate waren jedoch bei allen Patienten sehr gut. Dies bedeutet aber auch, dass eine vollständige Arthrode nicht unbedingt mit kompletter Schmerzfreiheit einhergehen muss¹⁶³.

2.6.5 Ossifikation und Einflussfaktoren

Viele Faktoren beeinflussen den Heilungsprozess und die Fusionsraten. Zum einen handelt es sich um Faktoren, die das autologe Knochentransplantat betreffen, wobei Ursprung (Crista iliaca oder Dornfortsatz), Art (spongiöser, kortikaler, kortikospongiöser Knochen) und Menge des Knochenmaterials sich entscheidend auf den Heilungsprozess auswirken können. Zum anderen wirken sich die Umgebungsbedingungen des Wirbelsäulensegments selbst auf den Fusionserfolg aus. Dabei spielen die lokale Durchblutung, die Ernährung und das Alter eine entscheidende

Rolle¹⁵⁷. Gute Blutversorgung, grosse dekortizierte Areale, mechanische Stabilität, Wachstumsfaktoren, BMPs und physiologische mechanische Belastung wirken sich positiv auf die Erreichung einer stabilen Fusion aus. Der gesamte Fusionsprozess ist abhängig vom Einwandern von Knochenvorläuferzellen und Entzündungszellen. Deshalb sollte gut darauf geachtet werden, dass das Weichteiltrauma, das unweigerlich durch den operativen Eingriff entsteht, so gering wie möglich gehalten wird und nekrotisches Gewebe im Rahmen der Operation entfernt wird. Eine gute Blutversorgung ist die Grundlage für die Bereitstellung von Nährstoffen, hormonellen Stimulantien, von Entzündungszellen und Knochenvorläuferzellen¹⁶⁴. Zum Unterschied zur Heilung von Frakturen langer Röhrenknochen, von segmentalen Defekten und einer anterioren Wirbelkörperfusion, wirken bei der posterolateralen Fusion keinerlei kompressive mechanische Kräfte. Im Rahmen der Knochenbildung bei der posterolateralen Fusion kommt es zunächst zum Einwandern von Osteoprogenitorzellen aus dem dekortizierten Knochenbett und dem umliegenden Gewebe. Durch einen gekoppelten Prozess aus Knochenresorption durch Osteoklasten und Aufbau von neuem Knochengewebe differenzieren sich Osteoprogenitorzellen zu Osteoblasten, die neue Knochenmatrix bilden. Neuer Knochen remodelliert sich dann entlang der Belastungsrichtung. In vielen Tiermodellen führt die Dekortizierung alleine schon zu einer Fusion¹⁶⁵. Eine Fraktur eines langen Röhrenknochens, die nur unzureichend fixiert ist (Cast) heilt über chondrale Ossifikation. Zunächst bildet sich ein Frakturhämatom, welches sich durch Metaplasie in fibröses Gewebe und anschliessend in Knorpel umwandelt. Der Knorpel wandelt sich dann in Knochen um. Die Fraktur wird stabilisiert und wird abhängig von der mechanischen Belastung remodelliert. Bei stabiler interner Fixierung einer Fraktur gelangen die Knochenenden bei optimaler Reposition in direkten Kontakt. Die Heilung erfolgt in diesem Fall über Kollagenbrücken (desmale Ossifikation)¹⁶⁶. Das Implantat fördert hierbei aber nicht den Heilungsprozess an sich. Im Gegensatz dazu gehen einige Studien davon aus, dass die Verwendung von instrumentierten Fusionsmethoden in der Wirbelsäulenchirurgie zu einer Verkürzung der Zeit, die für eine Fusion notwendig ist, führt und somit den Heilungsprozess fördert. Wenn im Rahmen der posterolateralen Fusion keine komplette Immobilisierung vorhanden ist läuft die Fusion in einer kartilaginösen, in einer osteogenetischen Phase und einer Remodellierungsphase ab¹⁶⁷. Viele experimentelle Studien verbinden ein hohes Mass an Stabilität mit desmaler Ossifikation und folglich mit besseren Fusionsraten und einer besseren Qualität der Fusionsmasse. Boden et al zeigte beispielsweise in einem Kaninchenmodell, dass

Lendenwirbel bei guter Fixierung rein über desmale Ossifikation fusionieren. In einer Studie von Foster et al konnte aber gezeigt werden, dass die Knochenbildung im Schafmodell sowohl bei stabiler als auch bei instabiler Fixierung über enchondrale Ossifikation abläuft. Bei den Tieren der stabilen Kontrollgruppe wurden L4 und L5 mittels Bandscheibenersatz und Pedikelschraubensystem fixiert. Bei den Tieren der unstabilen Gruppe wurde dasselbe Segment mittels Annulektomie destabilisiert und lediglich mit Pedikelschraubensystem fixiert. Die Heilung erfolgte in beiden Gruppen im Bereich der Basis der Transversalfortsätze über desmale Ossifikation und zwischen den Transversalfortsätzen über enchondrale Ossifikation. Die lumbare Arthrodese entsteht durch die kontrollierte heterotopische Knochenbildung im Weichteilgewebe. In Bereichen von direktem Knochen-Knochenkontakt erwartet man eine Heilung über desmale Ossifikation. Besteht jedoch eine Diskontinuität zwischen autologem Knochen oder Knochenersatzstoff und Knochen oder müssen grössere Distanzen überbrückt werden, wie es beispielsweise im Bereich der Transversalfortsätze von Schafen der Fall ist, erfolgt die Heilung der Fusion über enchondrale Ossifikation. Die kontrollierte Unstabilität hat im Modell von Forster zu einer vermehrten Bildung von Knorpel geführt, der sich schliesslich, als Antwort auf die mechanischen Kräfte im Bereich der Fusionsstelle, in Knochen umgewandelt hat¹⁶⁶. Auch im Hundemodell konnte gezeigt werden, dass sich die Fusion bei Anwendung der instrumentierten Methode über enchondrale Ossifikation ausbildet¹⁶⁸.

2.6.6 Wann genau ist eine Fusion stabil?

Wann genau eine stabile Arthrodese nach einer posterolateralen Fusion mit autologem Knochen eintritt, wird nach wie vor evaluiert. Zahlreiche radiologische Studien aus der Humanmedizin haben Zeiträume bis zur Fusion dokumentiert, aber das Intervall reicht von 6 Monaten bis zu 2-3 Jahren³⁻⁵. Manche Autoren haben den Fusionsgrad im Rahmen von Reoperationen evaluiert und eine komplette Fusion zwischen 4 und 5 Monaten anberaumt. Auch im Tiermodell werden oft sehr unterschiedliche Zeitspannen bis zur endgültigen Fusion angegeben. Im Kaninchenmodell reichen die angegebenen Zeiträume von 4-10 Wochen⁶⁻¹⁰. Bei Hunden wird zum Teil von stabilen Fusionen nach 6 Monaten berichtet, zum Teil gibt es Studien in denen nach 6 Monaten Fusionsraten von 50% angegeben sind^{168, 169}. Im Schafmodell variieren die publizierten Zeiträume eklatant und werden in einem Zeitraum von wenigen Wochen bis zu einem Jahr

anberaumt¹¹. Die in der Literatur angegebenen Fusionsraten und Zeiträume bis zur endgültigen Fusion bei nicht humanen Primaten verhalten sich ähnlich wie beim Menschen. Die exaktesten Methoden zur Evaluierung des Fusionsstatus sind die biomechanische und die histologische Untersuchung, beides Methoden die sich aus klinischer Sicht im Rahmen von Humanstudien nicht immer durchführen lassen. Beide Untersuchungsverfahren kommen aber in Tierversuchen zur Anwendung, in denen sie teilweise enorme Unterschiede bezüglich der Fusionszeiträume und Fusionsraten zur normalen Routinediagnostik erkennen lassen. Beispielsweise untersuchte Kanayama et al den Zusammenhang zwischen mechanischen, radiologischen und histologischen Eigenschaften der posterolateralen lumbalen Fusionsmasse am Schafmodell, um Veränderungen in der Lastverteilung zwischen Instrumentierung und Fusionsmasse im Heilungsverlauf zu erläutern. Es wurden die Segmente L3/L4 und L5/L6 zunächst destabilisiert. Ein Segment wurde mit Pedikelschraubensystem und autologem Knochen behandelt, das andere Segment diente als Negativkontrolle und wurde lediglich mit Pedikelschraubensystem fixiert. Frisch gefrorene Schafwirbelsäulen wurden derselben Technik unterzogen und dienten als 0-Wochen-Negativkontrolle. Biomechanische Tests zeigten, dass die Fusionsmasse bereits nach 4 Wochen mechanische Stabilität aufwies. Die Belastung des Instrumentariums verminderte sich stark ab der 8. Woche post operationem. Eine stabile Fusion konnte röntgenologisch erst nach 16 Wochen diagnostiziert werden. CT Untersuchungen und histomorphometrische Analysen zeigten, dass die Mineralisierung der Fusionsmasse erst nach 8 Wochen linear anstieg. Histologisch bestand die Fusionsmasse mit 8 Wochen hauptsächlich aus Geflechtknochen, der sich danach in Trabekelknochen umwandelte. In der Studie von Kanayama et al konnte gezeigt werden, dass bei Schafen die Fusionsmasse bereits 8 Wochen post operationem deutliche Anzeichen von Reifung des Gewebes und eine gute Stabilität aufweist. Die Mineralisation korrelierte mit der Stabilität und steigerte sich nach 4 Wochen kontinuierlich. Zwischen der instrumentierten Negativkontrollgruppe und der 0-Wochen-Kontrollgruppe konnten keine signifikanten Unterschiede verzeichnet werden¹⁷⁰.

2.7 Das Schaf als Versuchsmodell für die instrumentierte posterolaterale lumbare Fusion

Kennzeichen eines guten Tiermodells sind die Ähnlichkeit zu menschlichen anatomischen, biomechanischen und knochenbiologischen Verhältnissen¹². Im Unterschied zu der menschlichen Wirbelsäule sind beim Schaf 6 Lendenwirbel ausgebildet, die Transversalfortsätze sind länger und der Durchmesser der einzelnen Wirbel ist kleiner. Die Schafwirbelsäule ist jedoch als Modell für die posterolaterale Fusion interessant weil die Heilungsbiologie von autologen Knochentransplantaten ähnlich ist wie beim Menschen. Die Pedikel der Schaflendenwirbel sind ähnlich dimensioniert wie die der menschlichen Lendenwirbelkörper. Daher können Pedikelschrauben aus der Humanmedizin eingesetzt werden¹⁴⁴. Trotz quadrupeden Gangbild weist die Wirbelsäule des Schafes sehr ähnliche biomechanische Eigenschaften wie die des Menschen auf¹⁷¹. Allerdings ist zu erwähnen, dass die „Range of motion“ (ROM) in der Achsendrehung der Schafwirbelsäule nur halb so gross ist wie in der des Menschen¹⁷². Die Anwendung von autologem Knochen stellt im Rahmen der posterolateralen Fusion den „Golden Standard“ dar und wird daher immer als Referenz und Positivkontrolle bei der Testung anderer Verfahren verwendet. Zur Beurteilung der Fusion stehen röntgenologische, computertomographische, mechanische, histologische, histomorphometrische und mikrobiologische Verfahren zur Verfügung. Dabei ist zu erwähnen, dass die Fusionsergebnisse gerade bei der posterolateralen Fusion vom gewählten Diagnoseverfahren abhängen. Die in der Literatur beschriebenen Fusionsraten bei der Positivkontrolle beim Schaf bewegen sich zwischen 38-100%^{12, 14}. Aufgrund der bereits beschriebenen Nachteile im Zusammenhang mit der Entnahme und Anwendung von autologem Knochen wird immer mehr nach vergleichbaren oder besseren Produkten zur Erzielung guter Fusionsergebnisse gesucht. Daher werden Biomaterialien wie beispielsweise resorbierbare und nichtresorbierbare synthetische Knochenersatzstoffe im Rahmen von Tierversuchen klinisch auf ihre Biokompatibilität und Bioaktivität getestet¹³. Alternativen zu autologem Knochen, die bei Frakturen langer Röhrenknochen oder in Defektmodellen bereits erfolgreich eingesetzt wurden, müssen aber nicht automatisch auch bei Wirbelfusionsmethoden zu guten Ergebnissen führen. Während das Ziel bei der Behandlung von Frakturen oder Defekten eine Wiederherstellung der ursprünglichen Anatomie ist, werden im Rahmen der Wirbelsäulenchirurgie

pathologische Strukturen zerstört und ein mechanisch optimales Konstrukt hergestellt. Im Rahmen der posterolateralen Fusion soll diese Stabilität zur Ausbildung einer heterotopischen Knochenbrücke zwischen den Transversalfortsätzen und im Bereich der Facettengelenke führen. Der Fusionserfolg ist neben anderen Faktoren auch von der evolutionären Entwicklung der verwendeten Spezies abhängig. Während bei Primaten trotz Anwendung hochwertiger chirurgischer Verfahren oft nur sehr niedrige Fusionsraten erzielbar sind, können bei Tieren, die in der Evolution noch nicht so weit fortgeschritten sind, oft rein nur durch das Anheben des Periosts gute Fusionsergebnisse erreicht werden. Der Zeitraum bis zur endgültigen Fusion ist ebenfalls evolutionsabhängig. Während im Kaninchenmodell mit autologem Knochen gute Fusionsergebnisse bereits wenige Wochen nach der Operation zu erzielen sind, dauert es bei Schafen, Hunden und vor allem bei Primaten oft wesentlich länger. In der Literatur sind für die Verwendung von autologem Knochen in der posterolateralen Fusion spezies-spezifische Zeiträume bis zur endgültigen Arthrodesse angegeben, die als Standards für die Positivkontrolle im Vergleich von verschiedenen Knochenersatzstoffen herangezogen werden können. Gerade im Schafmodell variieren die in der Literatur angegebenen Zeiträume und Fusionsergebnisse massiv, was die Kontrolle der Effektivität von Biomaterialien sehr schwierig gestaltet¹¹ (siehe Tabelle 2.1).

Tabelle 2.1: Instrumentierte posterolaterale Fusion: Schafmodelle und Fusionszeiträume

Studie	Spezies	Keramik	Segment	Resultate
Baramki et al.	Schaf	Poröses Hydroxyapatit	L3-L4 L4-L5	Gruppe 1: Negativkontrolle Gruppe 2: autologer Knochen Gruppe 3: poröses HA + autologer Knochen Gruppe 4: HA Fusionsraten nach 5 Monaten: G1: 15%, G2: 100%, G3: 50%, G4: 72%
Walsh et al.	Schaf	Collagraft	L3-L4	Gruppe 1: Collagraft Gruppe 2: Collagraft + autologer Knochen Gruppe 3: autologer Knochen Nach 6 Monaten stabile Fusion in allen 3 Gruppen
Guigui et al.	Schaf	Porites™ Triosite™	L3-L4	Gruppe 1 (Vorstudie): autologer Knochen Gruppe 2: Porites™ Gruppe 3: Triosite™ Nach 12 Monaten stabile Fusion in allen 3 Gruppen
Kanayama et al.	Schaf	Autologer Knochen	L5-L6	Gruppe 1: autologer Knochen Gruppe 2: instrumentierte Negativkontrolle Biomechanische Fusion: 1 -2 Monate Histologische Fusion: 2 Monate Röntgenologische Fusion: 4 Monate

3 Material und Methoden

In der vorliegenden Studie wurde die Wirkung von autologem Knochen, PTH₁₋₃₄ in Fibrinmatrix und PTH₁₋₃₄ in Kombination mit MBCP in Fibrinmatrix anhand von 4 Gruppen zu je 6 Schafen am Modell einer instrumentierten posterolateralen Fusion getestet.

3.1 Verwendete Materialien

In dieser Studie wurden 3 verschiedene Materialien verwendet und verglichen. Gruppe A bestand aus einer Leerkontrolle (Negativ-Kontrolle). Gruppe B wurde mit autologem Knochen behandelt, der bekanntermassen als „Golden Standard“ für das eingesetzte

Verfahren einzustufen ist, weshalb Gruppe B auch als Positivkontrolle diente. Das kortikospongiöse Knochentransplantat wurde aus der Crista iliaca entnommen.

Gruppe C wurde mit Fibrin und PTH₁₋₃₄ behandelt. Beim verwendeten Fibrinkleber handelte es sich um einen bei -20°C tiefgefrorenen 2 – Komponentenkleber, der vor der Anwendung aufgetaut werden musste (Tisseel ® (Frozen), Baxter). Um PTH₁₋₃₄ lokal in einer Fibrinmatrix anwenden zu können, muss das Peptid modifiziert werden. Das einzelsträngige PTH₁₋₃₄ Molekül wird dabei N-terminal verlängert. Diese zusätzliche Sequenz erlaubt zum einen die kovalente Einbindung des Peptides in die Fibrinmatrix während des Koagulationsprozesses und zum anderen die proteolytische Freisetzung von PTH₁₋₃₄ durch einwandernde Zellen. Die Abbaurate von PTH korreliert also mit der zellulären Aktivität. Um PTH₁₋₃₄ in die Fibrinmatrix zu integrieren, musste das Fusionspeptid vor der Koagulation der Fibrinogenkomponente des Klebers zugefügt werden. Die 2 Komponenten des Klebers befanden sich in 2 separaten Applikatoren. Ein Applikator enthielt Fibrinogen, einen sythetischen Fibrinolyseinhibitor (Aprotinin), Faktor XIII und zusätzlich das Fusionspeptid. Der Inhalt des anderen Applikators setzte sich aus Thrombin und Kalziumchlorid zusammen. Beide Applikatoren wurden mittels Verbindungsstück vereinigt und die Inhalte gemischt. Um die adhäsiven Eigenschaften des Klebers voll nutzen zu können wurden die Bereiche medial und lateral der Stäbe des Pedikelschraubensystems weitestgehend durch Stillung von Blutungen (elektrische Koagulation) und Trocknung des OP Bereiches mittels Tupfer vorbereitet. Sämtliche Herstellungsschritte und natürlich auch die endgültige Applikation erfolgten unter sterilen Kautelen.

In Gruppe D wurde dasselbe Verfahren angewendet, mit dem Unterschied, dass dem Gemisch aus Fibrin und PTH vor der Einbringung noch ein Knochenersatzstoff (Tricos®, Baxter) hinzugefügt wurde. Tricos ist ein resorbierbares Knochenersatzstoff-Material, das osteokonduktiv wirkt und allmählich durch neu gebildetes Knochengewebe ersetzt werden kann. Es handelt sich dabei um eine Zweiphasenkeramik aus Kalziumphosphat, bestehend aus 60% Hydroxyapatit und 40% Beta-Tri-Kalziumphosphat (β-TCP). Das poröse Granulat besitzt eine Partikelgrösse von 1-2 mm. Die Mikroporosität (Porendurchmesser < 10µm) ermöglicht die Verteilung biologischer Flüssigkeiten für den Ionenaustausch. Die Makroporosität (Porendurchmesser von 300-600 µm) ermöglicht die Besiedelung der Keramik durch osteogene Zellen, die dann zu Lasten der Keramik neues Knochenmaterial bilden können.

3.2 Schafmanagement

Als Versuchstiere wurden sowohl Tiere aus eigener Zucht als auch zugekaufte Tiere verwendet. Tiere zum Ankauf wurden vom Händler nach Staffelegg transportiert, wo sich der gesamte Bestand von etwa 280 Versuchs- und Zuchttieren befindet. Die Schafe wurden dort separiert von den anderen Herden aufgestellt und gründlich untersucht. Die Untersuchung umfasste eine genaue klinische Untersuchung, die Bestimmung des Zahnalters, eine Trächtigkeitsuntersuchung, eine Beurteilung der Klauengesundheit und eine serologische Untersuchung auf Maedi/Visna. Die Trächtigkeitsuntersuchung erfolgte anhand einer rektalen und transkutanen ultrasonographischen Untersuchung. Tragende Tiere wurden zum Händler zurück gebracht. Es wurden nur Tiere angekauft, die im Rahmen der allgemeinen klinischen Untersuchung als gesund befundet wurden. Ausgeschlossen wurden Tiere mit Abweichungen von den durch die allgemeine Propädeutik festgelegten physiologischen Parametern (verm. Allgemeinbefinden, Husten, Nasenausfluss, Durchfall, Kachexie, etc.) und Tiere mit orthopädischen Problemen. Für die Untersuchung auf Maedi/Visna wurde den Schafen mittels Vacutainer – System (Bellivier Industrial Estate, Plymouth, Grossbritannien) und Serum Röhrchen Blut aus der Vena jugularis entnommen. Das gewonnene Blut wurde anschliessend an das virologische Institut der Vetsuisse – Fakultät Bern zur serologischen Untersuchung auf Maedi/Visna Antikörper geschickt. Die Tiere blieben mindestens bis zum Erhalt der Ergebnisse (2 Wochen) in Quarantäne. Waren positive Tiere zu verzeichnen, wurde das umgehend der zuständigen Behörde gemeldet und die betroffenen Tiere der Schlachtung zugeführt. Die negativen Tiere dieser Herde wurden weitere 2 Monate in Quarantäne gehalten, dann erneut getestet und bei Vorliegen eines negativen Ergebnisses zum Versuch zugelassen. Gesunde Tiere wurden mit bestandseigenen Ohrmarken gekennzeichnet, einer Klauenpflege unterzogen, geimpft und entwurmt. Die Mutterschafe wurden für die Geburt der Lämmer separiert aufgestellt, 2 Tage post partum in eine kleine Herde verbracht und 2 Wochen post partum wieder in die grosse Herde integriert. Die Böcke wurden jeweils 2-3 Monate in der Mutterherde gehalten und nach Ablauf dieser Zeit ausgetauscht, wobei die neuen Böcke natürlich vor der Integration in die Mutterherde klinisch untersucht wurden. Die Tiere wurden im Frühling und im Herbst geschoren. Im Abstand von jeweils 6 Wochen wurde der Gesundheitsstatus der Herde routinemässig erhoben und alle Tiere einer Klauenpflege unterzogen. Wöchentliche Kontrollen der gesamten Herde wurden

ebenfalls durchgeführt. Eine weitere Massnahme zur Aufrechterhaltung der Herdengesundheit war ein regelmässiges Entwurmungs – und Impfreime. Die antiparasitäre Behandlung umfasste eine halbjährliche subkutane Injektion von Ivermectin (Ivomec® ad us. vet, 0,2 mg/kg, Biokema SA, Crissier – Lausanne, Schweiz) und eine orale Applikation von Netobimin (Hapadex® ad us. vet., 5%, 4ml/10kg, Provet AG, Lyssach, Schweiz) oder Levamisol - Triclabendazol (Endex® ad us. vet., 19,5%, 1 ml/10 kg, Novartis Tiergesundheit AG, Bâle, Schweiz). Die Tiere wurden einmal jährlich mit Ovilis® Heptavac P ad us. vet. (2 ml/Tier s.c., Veterinaria AG Zürich, Schweiz) gegen schafrelevante Clostridien - und Pasteurellenstämme immunisiert, wobei sich die Grundimmunisierung aus 2 Impfungen im Abstand von 4 – 6 Wochen zusammensetzte.

3.3 Studienaufbau

Insgesamt wurden 24 weibliche, Schweizer Alpenschafe mit einem durchschnittlichen Alter von 2.2 Jahren (1,07 - 3,11 Jahre) und einem durchschnittlichen Gewicht von 60.9 kg (50-77 kg) in der Studie verwendet.

Die Handhabung der Tiere und die chirurgischen Eingriffe wurden gemäss den gesetzlichen Bestimmungen des schweizerischen Tierschutzgesetzes durchgeführt und vom kantonalen Veterinäramt genehmigt (Bewilligungsnummer: 05/2007).

Der Versuch wurde in eine Präliminär – und eine Hauptstudie geteilt. Bei allen Versuchstieren wurde eine lumbale posterolaterale Fusion mittels Pedikelschraubensystem durchgeführt. Im Zuge der Präliminärstudie wurden 6 Tiere als Negativkontrolle verwendet (Gruppe A: 4001, 4002, 4003, 4004, 4005, 4006). Bei ihnen wurden lediglich die Facettengelenke aufgefrischt und die Lamina dekortiziert. In Gruppe B der Präliminärstudie wurde bei 6 Schafen (4007, 4008, 4009, 4010, 4011, 4012) bilateral ein autologes Knochentransplantat eingebracht, das zuvor aus der Crista iliaca entnommen wurde. Diese Gruppe diente als Positivkontrolle. Ziel der Präliminärstudie war es den genauen Zeitpunkt der Fusion beider Gruppen zu ermitteln. In der Literatur ist dieser für beide Verfahren beim Schaf bislang nicht genau beschrieben. Der längste Fusionszeitraum, der in der Literatur im Schafmodell angegeben ist, beträgt ein Jahr. Aus diesem Grund wurden die Tiere der Präliminärstudie erst nach einem Jahr getötet. Um den genauest möglichen Zeitpunkt der Fusion bestimmen zu können wurden alle Tiere der Präliminärstudie monatlich

röntgenologisch untersucht. 6 Tiere der Präliminärstudie, 4 der Gruppe A (4002, 4004, 4005, 4006) und 2 der Gruppe B (4008, 4010), wurden zusätzlich im Abstand von 4 Wochen einer computertomographischen Untersuchung unterzogen. Für die Hauptstudie wurden ebenfalls insgesamt 12 Tiere verwendet. Bei 6 Tieren (4013, 4017, 4019, 4020, 4021, 4027) wurde ein Gemisch aus Fibrin und PTH beidseits medial und lateral der Stäbe eingebracht. Bei weiteren 6 Schafen (4014, 4015, 4016, 4018, 4025, 4026) wurde zur Unterstützung der Fusion Fibrin in Kombination mit PTH und MBCP verwendet. Die Tiere der Hauptstudie wurden nach 3 Monaten röntgenologisch und computertomographisch auf Anzeichen von neu gebildeten Knochen untersucht. Insgesamt überlebten sie für 4 Monate (siehe Tabelle 2). Alle verwendeten Versuchstiere wurden durch Schlachtung getötet. Danach wurde das Ausmass an neu gebildetem Knochen und der Fusionsgrad adspektorisch, palpatorisch, röntgenologisch und histologisch evaluiert. Ein Überblick über die einzelnen Gruppen und die Versuchsanordnung kann Tabelle 3.1 entnommen werden.

Tabelle 3.1: Überblick über die Versuchsanordnung

Gruppe	Implantat	Anzahl Tiere	Anzahl Proben	Schaf- Nr.	Alter (J)	KGW (kg)	Schlachtung (Wo)
Präliminärstudie							
A	Negativ- kontrolle	6	12	4001	2.03	64	48
				4002	2.03	61	
				4003	2.03	61	
				4004	2.03	63	
				4005	2.03	69	
				4006	2.03	50	
B	Autologer Knochen	6	10	4007	2.04	52	48
				4008	2.03	66	
				4009	2.03	77	
				4010	2.03	56	
				4011	2.04	65	
				4012	2.07	63	
Hauptstudie							
C	Fibrin PTH	6	10	4013	2.02	52	16
				4017	2.03	65	
				4019	3.11	62	
				4020	3.02	57	
				4021	3.03	60	
				4027	3.06	65	
D	Fibrin MBCP PTH	6	8	4014	2.02	52	16
				4015	2.01	59	
				4016	2.09	54	
				4018	2.09	50	
				4025	3.01	88	
				4026	1.07	50	

3.4 OP

3.4.1 Präoperatives Management und Anästhesie

Die Schafe wurden etwa 1 Woche vor der geplanten Operation von Staffelegg ins Tierspital transportiert. 3 Tage vor der Operation wurden die Schafe gewogen, ihnen Blut für Blutchemie und Hämatologie entnommen und sowohl das OP Feld, sowie auf einer Halsseite der Bereich der Vena jugularis für den Venenzugang geschoren. Die wichtigsten Vitalparameter wurden erhoben (Schleimhäute, Herzfrequenz, Atemfrequenz, Auskultation von Herz, Lunge und Abdomen, Kapillarfüllungszeit, Blutangebot, innere Körpertemperatur). Die Schafe hungerten 24 Stunden vor der

Operation, wobei sie immer Zugang zur Tränke hatten. Eine Stunde vor Einleitung wurden die für die Sedierung relevanten Parameter erhoben (Herz – Kreislaufsystem). Bei physiologischen Werten wurde mit Xylazin 20 mg (Xylazin Streuli® ad us.vet., 0,1 mg/kg i.m., Streuli Pharma AG, Ulznach, Schweiz) und Buprenorphin (Temgesic®, 0,01 mg/kg i.m., Essex Chemie AG, Luzern, Schweiz) praemediziert. Nach aseptischer Reinigung wurde eine Venenverweilkanüle (Intraflon 2, Vycon, Frankreich) in eine der beiden venae jugularis gesetzt. Diese wurde mit Supramid® (Polyamid, 2/0, Braun, Aesculap AG und CO.KG, Tuttlingen, Deutschland) mittels Einzelheften an die Haut fixiert und einem speziellen Verschluss (IN-Stopper, Braun, Deutschland) kombiniert. Kurz vor Einleitung erhielten die Tiere Benzylpenicillin (Penicillin Natrium Streuli® ad us.vet., 20000 IU/kg i.v., Streuli Pharma AG, Schweiz) und Gentamicin (Vetagent® ad us. vet., 6 mg/kg i.v., Veterinaria AG, Schweiz) als praeoperative Antibiose und Carprofen (Rimadyl®, 4 mg/kg i.v., Pfizer AG, Schweiz) als Analgesie, sowie equines Tetanusantitoxin (Tetanus – Serum Intervet, 3000 IU s.c., Vertrieb Veterinaia AG, Schweiz). Danach erhob der Anästhesist erneut die wichtigsten Vitalparameter (Herz, Lunge, Kapillarfüllungszeit, Schleimhäute, Blutangebot, Pansenmotorik), kontrollierte den Sitz und die Durchgängigkeit der Braunüle und leitete bei physiologischen Bedingungen mit Diazepam (Valium®, 0,2 mg/kg i.v., Roche Pharma, Schweiz) und Ketamin (Narketan® 10%, 3 mg/kg i.v., Vëtoquinol, Schweiz) die Anästhesie ein. Das Schaf wurde dann in Brust – Bauchlage verbracht und der Kopf maximal gestreckt. Die Maulspalte wurde mit Hilfe von 2 Bändern geöffnet und die Zunge mittels Tupfer weit nach rostral gezogen. Unter Anwendung von Lidocainspray wurde die Epiglottisgegend lokal anästhesiert. Sobald der Schluckakt entfallen war wurde mit Hilfe eines Laryngoskops die Epiglottis nach lingual gedrückt und der Tubus (meistens Gösse 11) bei der Inspiration zwischen den beiden Aryknorpeln in die Trachea geschoben. Der richtige Sitz wurde kontrolliert und der Tubus bei Bestätigung gekufft und am Unter – oder Oberkiefer fixiert. Danach wurde das Tier vorsichtig auf den Tisch gehoben und in die gewünschte Position gebracht. Die Anästhesie wurde mit 1,5 – 2,5% Isofluran in Sauerstoff (IsoFlo® ad us.vet., Abbott, Schweiz) erhalten. Bei Erhöhung des Blutdruckes und der Herzfrequenz wurde zusätzlich Propofol (Propofol® 1% Fresenius, Fresenius Kabi, Schweiz) über Perfusor verabreicht (Bolus: 0,1 mg/kg für 5 Minuten, 0,2 mg/kg zur Erhaltung). Beide Augen wurden mit Augensalbe (Vitamin A Augensalbe, Bausch und Lomb, Schweiz) versorgt, um die Kornea vor Austrocknung

zu schützen. Für die Anästhesie wurde ein halbgeschlossenes System verwendet. Das Monitoring umfasste EKG (Herzfrequenz, Arrhythmien), Pulsoxymetrie (inspiratorische Partialdrücke von Kohlendioxid, Sauerstoff und Isofluran), invasiven Blutdruck (mittlere Ohrvene), Atemwegsdruck – und Volumenkurven, oesophageale Temperatur und eine ständige Überwachung des Patienten durch den Anästhesisten. Zur Unterstützung erhielt das Schaf während der gesamten Operationsdauer körperwarmer Ringer – Laktat – Lösung (5000ml, 10ml/kg/h i.v., Fresenius Kabi, Schweiz) als Dauertropfinfusion und Wärmetherapie (Bair Hugger®). Zur Erhaltung des Blutdrucks wurde den Schafen bei Bedarf 10% Haes (Haes-steril®, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) infundiert. Bei Regurgitieren wurde eine Schlundsonde gesetzt. Die Tiere wurden in Vollnarkose mit projektbezogener Ohrmarke (Allflex, Schweiz) und Chip (Data Mars Sa, Provet, Schweiz) gekennzeichnet.

3.4.2 OP Technik

Nach aseptischer Vorbereitung des OP Feldes wurden die Dornfortsätze von L4 und L5 durch digitale Palpation ermittelt. Oberhalb der Dornfortsätze wurde in der Medianen ein etwa 7 cm langer Hautschnitt gemacht. Nach scharfer Durchtrennung der Subkutis und der Lumbarfaszie wurde bilateral der Dornfortsätze in die Tiefe bis zu den Querfortsätzen von L4 und L5 präpariert. Hämostase erfolgte mittels bipolarer Koagulation. Mittels Raspatorium und Tupfer wurde das Periost gemeinsam mit der paraspinalen Muskulatur stumpf von den Dornfortsätzen und der Lamina des Wirbelbogens bis auf Höhe der Querfortsätze von ihrer Unterlage gelöst. Das Spinalsegment wurde mit 2 Hohmannhebeln angehoben, um die Sicht auf die Facettengelenke zu verbessern. Die Pedikel wurden von Weichteilgewebe freipräpariert, die Facettengelenke mittels Luer Zange aufgefrischt und die Transversalfortsätze dekortiziert. Danach wurde der äussere Kortex des Pedikels mittels Pedikelahle eröffnet und mittels Pedikelvertiefungsahle ein Kanal im Wirbelkörper geschaffen. Beim Erreichen des distalen Kortex wurde gestoppt, die Länge des Kanals mittels Tiefenmessgerät gemessen und sichergestellt, dass keine Perforation des Wirbelkanals vorliegt. Mittels selbsthaltendem Schraubenzieherschaft und Griff wurden die Schrauben in beide Pedikel eingebracht, wobei sie in derselben Längsachse ausgerichtet wurden. Bei den verwendeten Schrauben handelte es sich um vormontierte Pedikelschrauben mit dualem Kern und seitlicher Öffnung, die durch das

Vorhandensein eines Kortikalis – und Spongiosagewindes einen guten Halt im Knochen gewährleisteten (USS Universal Spine System, Synthes®). Es war nicht notwendig ein Gewinde zu schneiden, da die Schrauben mit einem selbstschneidenden Gewinde ausgestattet waren. Nach dem Setzen der Schrauben wurde die geeignete Stablänge bestimmt und die Stäbe wenn nötig mit dem Seitenschneider gekürzt oder mit Stabbiegezange gebogen. Der Stab wurde anschliessend mittels Stabstössel fest in die Köpfe der Pedikelschrauben gedrückt, wobei bei richtigem Sitz ein deutliches Einschnappen spürbar war. Danach wurden die Verschlusskappen auf die Köpfe der Schrauben platziert und die Spannmutter mit hexagonalem Schraubenzieher im Uhrzeigersinn auf das Gewinde oberhalb der Verschlusskappe gedreht. Das Festdrehen der Mutter erfolgte mittels hexagonaler Haltehülse und Repositionsgriff. Auf der kontralateralen Seite wurde dasselbe Verfahren angewendet. Vor dem Verschluss der Operationswunde wurden in die medialen und lateralen Rinnen um das Implantat jeder Seite verschiedene Materialien entsprechend der unterschiedlichen Gruppen eingebracht. Zu diesem Zweck wurde die Wundhöhle unter Zuhilfenahme von Langenbeck Wundhaken maximal gespreizt.

Bei der negativen Kontrollgruppe wurden die Bereiche um die beiden Stäbe nicht befüllt. Bei den Tieren der Positivkontrollgruppe (autologes Knochentransplantat) wurde der Hautschnitt nach caudal bis über den Tuber coxae verlängert oder ein separater Hautschnitt angelegt. Der etwa 4 cm lange separate Hautschnitt wurde vom Lateralende des Tuber coxae über die Crista iliaca verlaufend in Richtung Ileosakralgelenk angelegt. Nach Durchtrennung der Subkutis, der Beckenfaszie und des M. gluteus medius wurde in die Tiefe präpariert. Danach wurde auf der Caudalseite der Crista iliaca Knorpel entfernt und der Kortex und Teile der Spongiosa mittels Hammer und Meissel abpräpariert (kortikospongiöses Knochentransplantat). Das gewonnene Transplantat wurde in Streifen geschnitten und bis zum Zeitpunkt der Transplantation in Eigenblut konserviert. Der Donorbereich wurde mit Knochenwachs abgedeckt um Blutungen zu vermeiden. Der M. gluteus medius wurde durch eine fortlaufende Naht (Vicryl® Polyglactin, 2/0, Johnson & Johnson Int., Brüssel, Belgien) an der Crista iliaca im Bereich seiner Insertionsstelle befestigt. Die Faszie und die Subkutis wurden unter Verwendung von Vicryl® (Polyglactin, 2/0, Johnson & Johnson Int., Brüssel, Belgien) in 2 Schichten fortlaufend genäht. Für den Verschluss der Haut wurde ein Stapler (Auto Suture Appose ULC®, United States Surgical, Norwalk, USA) verwendet. Ein Stent wurde zum Schutz vor Kontamination der Wunde angebracht. Der

korrekte Sitz der Schrauben wurde fluoroskopisch anhand einer dorsoventralen und laterolateralen Aufnahme überprüft. Bilder des Instrumentariums und der Operationsmethode sind im Anhang zu finden (Abb.1-15).

3.4.3 Postoperatives Management

Nach Beendigung der Operation wurde das Monitoring abgeschaltet und das Inhalationsanästhetikum auf 0 reduziert. Die Tiere wurden mit Sauerstoff versorgt, vorsichtig vom Tisch auf ein Transportvehikel gehoben und nach erfolgtem Schluckakt extubiert. Anschliessend wurden die Tiere unter ständiger Fixierung in eine frisch eingestreute Box transportiert, wo sie in Brust – Bauchlage bei gesenktem Kopf unter ständiger Betreuung aufwachen konnten. Nach vollständiger Rehabilitation wurde sofort Heu angeboten. Inklusiv Operationstag erstreckte sich die bereits präoperativ begonnene antibiotische Abdeckung der Tiere auf insgesamt 5 Tage, wobei Benzylpenicillin (Penicillin Natrium Streuli® ad us.vet., 20000 IU/kg i.v., Streuli Pharma AG, Schweiz) im 12 Stundenintervall und Gentamicin (Vetagent® ad us. vet., 6 mg/kg i.v., Vetarinaria AG, Schweiz) einmal täglich verabreicht wurde. Die Antiphlogese und Analgesie wurde mit der einmal täglichen Verabreichung von Carprofen (Rimadyl®, 4 mg/kg i.v., Pfizer AG, Schweiz) für weitere 4 Tage post operationem fortgesetzt. Bei den Tieren der positiven Kontrollgruppe (autologer Knochen) wurde die analgetische Versorgung um einen Tag verlängert, da die Entnahme von autologem Knochen im Bereich der Crista iliaca bekanntermassen mit einem höheren Schmerzpensum einhergeht. Am Operationstag selbst wurde die analgetischen Komponente im Behandlungsregime durch eine dreimalige Gabe von Buprenorphin (Temgesic®, 0,01 mg/kg i.m., Essex Chemie AG, Luzern, Schweiz) im 4-Stunden-Rhythmus ergänzt. Nach 3 Tagen erfolgte die Entfernung der Wundabdeckung. Aufgrund der gewählten Fusionsmethode war es den Tieren möglich sich sofort nach der Operation frei zu bewegen. Aus Sicherheitsgründen wurden sie aber in den ersten 3 Tagen in einer kleinen Box unter Bewegungsrestriktion gehalten. Für eine weitere Woche verbrachte man die Tiere dann in eine grössere Bucht, die eine freiere Bewegung gewährleistete. Die Tiere wurden in dieser Zeit zweimal täglich kontrolliert, wobei im Rahmen der Allgemeinuntersuchung speziell auf neurologische Ausfallerscheinungen und auf Veränderungen im OP Bereich geachtet wurde. Verhielten sich die Tiere klinisch und neurologisch unauffällig konnten sie nach Ablauf

der eineinhalbwöchigen Beobachtungszeit nach Staffelegg transportiert, in die Herde integriert und sowohl in grossen Buchten im Stall als auch auf der Weide gehalten werden. Die Entfernung der Hautklammern erfolgte 10-14 Tage nach der OP. Für Röntgen – und CT Termine wurden die Tiere einen Tag vor geplanter Untersuchung vom Staffelegg an die Klinik transportiert und bei Röntgenterminen am selben Tag, bei CT – Terminen am darauffolgenden Tag zurücktransportiert. Im Rahmen der routinemässigen Gesundheitschecks, der wöchentlichen Kontrollen und während der Aufenthalte an der Klinik wurde auf klinische und neurologische Abnormalitäten geachtet und die Tiere gegebenenfalls therapiert.

3.5 Evaluierungsmethoden ante mortem

3.5.1 Röntgen

Die erste röntgenologische Kontrolle erfolgte direkt nach der Operation mittels C-Bogen, um den Sitz des verwendeten Schraubensystems zu kontrollieren. Zu diesem Zweck wurde von allen Schafen eine laterolaterale und dorsoventrale Aufnahme geschossen. Die Strahlendosis wurde abhängig von der Grösse und der Körpermasse der Tiere gewählt und lag in der dorsoventralen Aufnahme zwischen 79 kv (4,2 mas) und 110 kv (3,0 mas) und in der laterolateralen zwischen 66 kv (3,0 mas) und 96 kv (3,9 mas). Zur Beurteilung der Veränderungen im Bereich der Facettengelenke wurden alle 11 Tiere der Präliminärstudie nach der Operation in 4 – Wochen – Abständen röntgenologisch kontrolliert. Die Tiere der Hauptstudie wurden im Rahmen ihrer Überlebenszeit nur 1 mal 3 Monate nach der Operation röntgenologisch untersucht. Es wurden jeweils zwei oblique und eine laterolaterale Aufnahme der Lendenwirbelsäule bei einer Einstellung von 70 kV und 45 mAs geschossen, wobei ein digitales Röntgensystem der Firma Siemens verwendet wurde.

Die Bildsequenzen der Vorstudie wurden von 2 erfahrenen Radiologen unabhängig voneinander und in Unkenntnis der Gruppenzugehörigkeit des jeweiligen Schafes anhand eines semiquantitativen Scoresystems bewertet. Vorhandene Subluxationen zwischen den Wirbeln L4/L5 wurden in der laterolateralen Aufnahme beurteilt. Die festgelegten Kriterien einer Subluxation waren eine sowohl im Wirbelkanal als auch an der anterioren Fläche der Wirbelkörper ersichtliche Verschiebung der beiden Wirbel gegeneinander, sowie ein nach ventral offener Winkel der beiden Endplatten, sprich ein

Verlust ihrer Parallelität. Das Ausmass der Subluxation wurde durch die Messung des knöchernen Überstandes des subluxierten Wirbels vom physiologischen Niveau des Wirbelkanals oder der anterioren Wirbelkörperfläche mittels handelsüblichen Lineal gemessen. Die Dimensionen wurden in Zentimetern angegeben. Das Facettengelenk zwischen L4 und L5 wurde vergleichend zum Facettengelenk 2 Wirbel weiter cranial betrachtet. Die Kontur und die Knochendichte der gelenkbildenden Strukturen wurden in den obliquen Aufnahmen sowohl für das linke als auch für das rechte Gelenk beurteilt (siehe Abb.20 im Anhang). Das semiquantitative Scoresystem für die Kontur der gelenkbildenden Strukturen wurde folgendermassen gewählt:

Score	Kontur der gelenkbildenden Strukturen
0	Nicht sichtbar
0,5	Zum Teil sichtbar
1	Zur Gänze sichtbar

Für die Beurteilung der Knochendichte wurde folgendes semiquantitatives Scoresystem erstellt:

Score	Knochendichte
0	Stark verringerte Knochendichte
1	Geringer als die Knochendichte des Gelenks 2 Wirbel weiter cranial
2	Vergleichbar mit der Knochendichte des Gelenks 2 Wirbel weiter cranial
3	Höher als die Knochendichte des Gelenks 2 Wirbel weiter cranial

Die Ergebnisse der Röntgenbeurteilung ergaben sich aus einer Diskussion beider Betrachter. Die Bilder der Hauptstudie wurden keiner Beurteilung zugeführt, da nach Durchsicht der Bilder der Vorstudie die Aussagekraft der röntgenologischen Evaluierungsmöglichkeiten des Fusionsstatus stark angezweifelt wurden.

3.5.2 Computertomographie

Zur genaueren Beurteilung von Fusionsgrad und Knochenneubildung wurden bei 6 Schafen der Präliminärstudie, 4 der Gruppe A (4002, 4004, 4005, 4006) und 2 der Gruppe B (4008, 4010), computertomographische Untersuchungen postoperativ in 4 Wochenabständen durchgeführt, bei allen Tieren der Hauptstudie nur einmal 3 Monate nach der Operation. Der Beginn der computertomographischen Untersuchung der Schafe der Vorstudie differierte innerhalb der beiden Gruppen insofern, als dass bei den

Schafen 4002, 4004 und 4005 erst 16 Wochen nach der Operation mit den Untersuchungen begonnen wurde, während von den Schafen 4006, 4008 und 4010 die ersten Bilder bereits 12 Wochen nach der Operation vorhanden waren. Die letzte Untersuchung vor der Schlachtung wurde bei den Schafen 4002, 4004, 4005 48 Wochen, bei den Schafen 4006, 4008 und 4010 44 Wochen nach der Operation durchgeführt. Die CT Untersuchung erfolgte in Rückenlage und Allgemeinanästhesie. Die Tiere wurden 24 Stunden vor dem CT Termin gehungert und eine Stunde davor nach kurzer klinischer Untersuchung mit Xylazin 20 mg (Xylazin Streuli® ad us.vet., 0,1 mg/kg i.m., Streuli Pharma AG, Uznach, Schweiz) prämediziert. Nach Schur und aseptischer Reinigung einer der beiden Halsseiten im Bereich der vena jugularis wurde ein Venenzugang (Intraflon 2, Vycon, Frankreich) gelegt. Die Einleitung erfolgte nach klinischer Untersuchung durch den Anästhesisten mittels Diazepam (Valium®, 0,1 mg/kg i.v., Roche Pharma, Schweiz) und Ketamin (Narketan® 10%, 3 mg/kg i.v., Vêtoquinol, Schweiz). Propofol (Propofol® 1% Fresenius, 2 mg/kg i.v., Fresenius Kabi, Schweiz) wurde bis zur Intubierbarkeit zusätzlich verabreicht. Statt Lidocainspray wurde Lidocain (Xylesin® 2%, 20 mg/kg, Amino AG, Schweiz) zur besseren Intubierbarkeit intravenös appliziert. Nach Einleitung wurden die Schafe intubiert und vorsichtig auf den Tisch gehoben und in Rückenlage verbracht. Die Anästhesie wurde mit 1,5 – 2,5% Isofluran in Sauerstoff (IsoFlo® ad us.vet., Abbott, Schweiz) erhalten. Der weitere Hergang der Anästhesie entsprach dem der Operation.

Für die eigentliche CT-Untersuchung wurde ein Gerät der Firma Siemens verwendet (Somatom Sensation Open). Die CT wurde von cranial nach caudal mit 3 mm Schichtdicke bei 120 kV und 300-400 mAs in Transversalschnitten gefahren. Zur Minimierung der durch die Schrauben entstandenen Artefakte wurde die Schichtdicke auf 1,5 mm und der Weichteil – und Knochenalgorithmus durch eine erweiterte CT – Skala rekonstruiert. Nach Beendigung der Untersuchung wurde das Inhalationsanästhetikum auf 0 reduziert und stattdessen Sauerstoff angeboten. Danach wurden die Tiere vom Tisch auf den Boden gehoben und in Brust – Bauchlage verbracht. Nach Erkennen des Schluckaktes wurden die Tiere extubiert. Während der Aufwachphase standen die Tiere unter ständiger Beobachtung. Nach vollständiger Erholung von der Anästhesie wurde die Venenverweilkanüle entfernt, die Tiere zurück in den Stall gebracht und mit Heu versorgt.

Die Beurteilung der Bildsequenzen der Vorstudie und der Bilder der Hauptstudie erfolgte durch 2 CT - erfahrene Radiologen unabhängig voneinander und in Unkenntnis

der Gruppenzugehörigkeit des jeweiligen Schafes anhand von folgendem semiquantitativen Scoresystem:

Score	Fusionsgrad
1	0-20% fusioniert
2	21-40% fusioniert
3	41-60% fusioniert
4	61-80% fusioniert
5	>80% fusioniert

Das Facettengelenk von L4/L5 wurde jeweils in einer Transversal – und einer Frontalebene beurteilt, wobei transversal von cranial nach caudal und frontal von ventral nach dorsal vorgegangen wurde. Um ein optimales Bild zu erhalten wurden 4 Schichten zusammengezogen und die Fensterlage und -mitte angepasst. Der Gelenkspalt wurde hinsichtlich Fusionsgrad, die subchondrale Knochenplatte auf Veränderungen der Knochendichte untersucht. Als fusioniert wurden knochenüberbrückte Areale des Gelenkspaltes angesehen. Die Scoringergebnisse ergaben sich aus der subjektiven Einschätzung des prozentualen Anteils der knochenüberbrückten Bereiche am gesamten Gelenkspalt (siehe Abb.23+24 im Anhang).

3.6 Evaluierungsmethoden post mortem

3.6.1 Probengewinnung, makroskopische Beurteilung und Röntgen

Die Tiere der Präliminärstudie wurden 12 Monate, die Tiere der Hauptstudie 4 Monate nach der Operation geschlachtet. Im Rahmen der Schlachtung wurden sie zunächst durch Bolzenschuss betäubt und anschliessend durch Entbluten getötet. Um vergleichende Untersuchungen durchführen zu können wurde danach bei allen Tieren das Segment L4/L5 mit den proximal und distal direkt angrenzenden Segmenten entnommen und von vorhandenen Weichteilen befreit. Nachdem die Probe mit in situ belassenem Pedikelsystem photographisch festgehalten worden war (Canon) wurde das Konstrukt entfernt. Es erfolgte eine adspektorische Einschätzung der Knochenmassenzunahme und eine palpatorische Prüfung der Beweglichkeit des

behandelten Segmentes L4/L5 vergleichend zu den angrenzenden, unbehandelten proximalen und distalen Segmenten. Alle Proben wurden immer von der gleichen Person beurteilt. Knochenmassezunahmen im Bereich der Facettengelenke wurden im linken und rechten Facettengelenk unabhängig voneinander beurteilt, wobei folgendes semiquantitatives Scoresystem eingesetzt wurde:

Score	Knochenmassenzunahme
0	Nicht vorhanden
1	Geringgradig
2	Mittelgradig
3	Hochgradig

Der Fusionsstatus der einzelnen Facettengelenke wurde wie folgt beurteilt:

Score	Fusionsstatus
0	Keine Fusion
1	Bewegungseinschränkung
2	Fusion

Die Beweglichkeit wurde in allen Achsen mit dem personenspezifischen immer annähernd gleichen Kraftaufwand getestet. Der Schrauben-Knochenkontakt wurde beim Entfernen der Schrauben als sehr gut, gut, mindergut und schlecht beurteilt. Die Evaluierung des Schrauben-Knochenkontaktes wurde aus Mangel an definitiven Messwerten und der Subjektivität der Beurteilung durch eine Einzelperson nicht statistisch ausgewertet. Nach erfolgter Untersuchung wurden die Probe erneut von dorsal photographiert (Canon), um die knöchernen Zubildungen zu dokumentieren. Anschliessend wurde eine dorsoventrale Röntgenaufnahme mittels Faxitron (55 kV, 5 s, Cabinet x-ray-faxitron series, model 43855A, Hewlett Packard, Mc Minnville Division, Oregon, USA) vom Segment angefertigt, um etwaige Veränderungen der Facettengelenke besser beurteilen zu können. Mittels Säge wurde anschliessend das proximale und distale, nicht behandelte Segment entfernt, die Probe in der Medianen geteilt und die Transversalfortsätze abgesetzt. Die Segmenthälften wurden dann separat in beschrifteten, mit 4%igem, gepufferten Formalin befüllten Gläsern deponiert. Für die Transporte wurden die Proben mit in 0,9%igem NaCl getränkten Tupfern umhüllt und in beschriftete Gefrierbeutel verpackt, um sie vor Austrocknung zu schützen.

Die postmortalen Röntgenbilder der Segmente L4/L5 wurden hinsichtlich Erkennbarkeit der Konturen der gelenkbildenden Knochenanteile und der

Knochendichte der Facettengelenke von 2 erfahrenen Radiologen unabhängig voneinander und in Unkenntnis der Gruppenzugehörigkeit des jeweiligen Schafes anhand semiquantitativer Scoresysteme bewertet (Scoresysteme siehe unter 3.5.1). Die Ergebnisse dieser Beurteilung ergaben sich aus der direkten Absprache beider Betrachter.

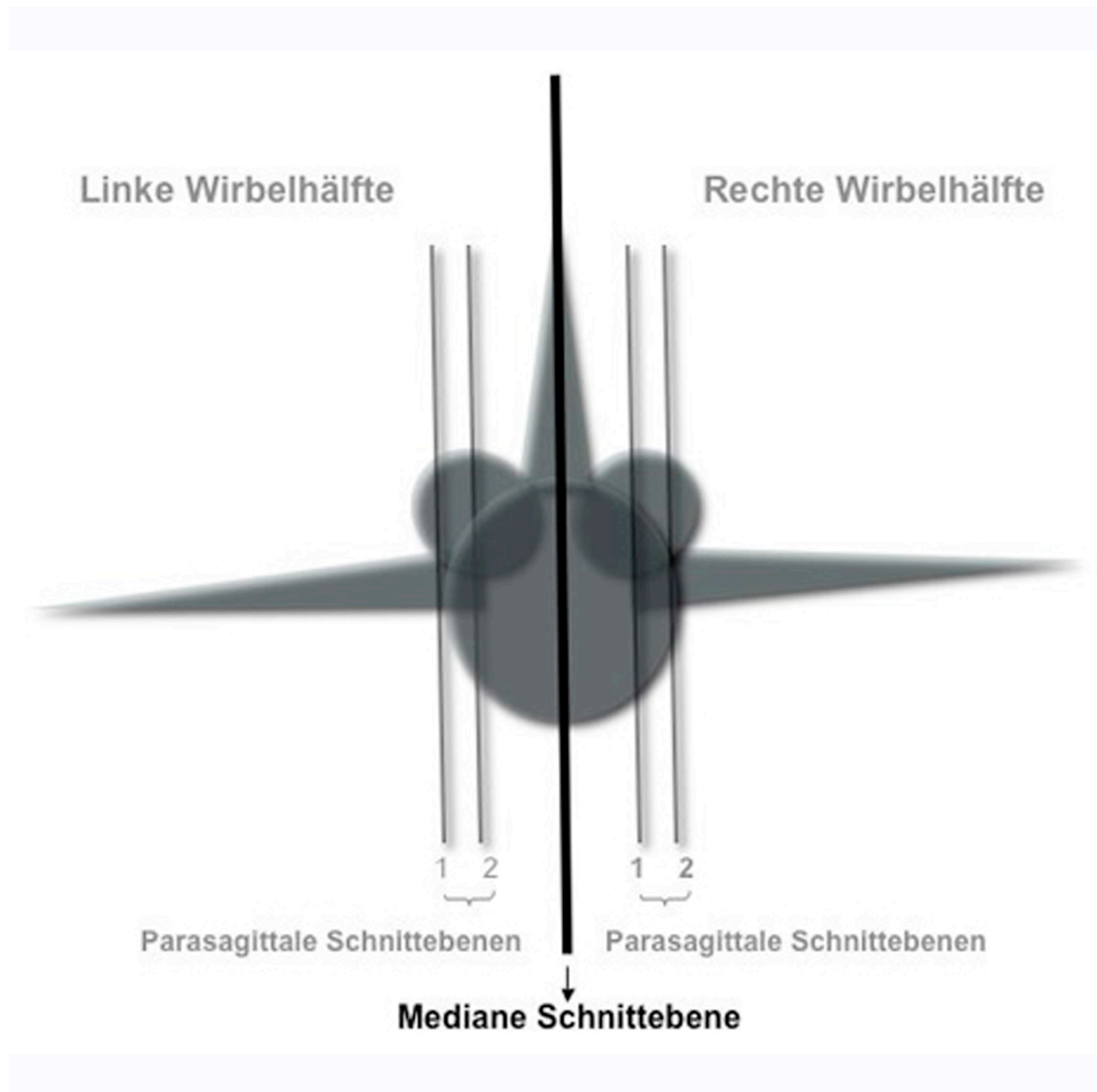
3.6.2 Probenaufbereitung und Histologie

Die Proben wurden zur Fixierung für etwa 7 Tage in beschrifteten Gläsern in 4%iger gepufferter Formalinlösung belassen. Danach wurden sie jeweils im Abstand von 20 Minuten 3 mal mit entionisiertem Wasser gespült. Die Entwässerung der Proben erfolgte anschliessend in einer aufsteigenden Alkoholreihe:

- 3x30 Minuten in 50%igen Ethanol
- 2x12 Stunden in 70%igen Ethanol
- 2x12 Stunden in 80%igen Ethanol
- 1x12 Stunden in 90%igen Ethanol
- 1x12 Stunden in 96%igen Ethanol
- 4x12 Stunden in 100%igen Ethanol

Die Entfettung wurde mittels Xylol durchgeführt. Hierfür wurden die Proben für 3 Tage im Vakuum belassen, um die Entfernung von Sauerstoffresten und eine gute Durchtränkung mit Xylol zu gewährleisten. Danach wurde Xylol gewechselt und die Proben für einen weiteren Tag darin belassen. Die Proben wurden anschliessend in flüssiges Methylmethacrylat (MMA) verbracht und 7-10 Tage lang bei 4°C im Vakuum infiltriert. Die Herstellung des Methylmethacrylats erfolgte nach folgendem Schema: Methacrylacid-methylester (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz), Dibutylphthalat (Merck-Schuchardt ® OHG, Hohenbrunn, Deutschland) und Perkadox 16 (Dr. Grogg Chemie AG, Stetten, Schweiz) wurden im Verhältnis 89,5:10:0,5 gemischt und 20 Minuten lang mit einem Magnetrührer homogenisiert. Nach der Infiltration mit MMA wurden die Proben eingebettet. Dabei wurden die Probengläser mit MMA aufgegossen, bis die Knochenstücke vollständig bedeckt waren. Zur Polymerisation wurden sie anschliessend für etwa 10-21 Tage im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Danach wurden sie für mehrere Tage in ein unbeheiztes Wasserbad verbracht. Um die Polymerisation

abzuschliessen wurden die Proben noch für einige Tage im Wärmeschrank bei 37,5°C aufbewahrt. Um die Entfernung der MMA Blöcke aus den Gläsern zu erleichtern wurden sie mindestens für eine Stunde im Tiefkühler gelagert und anschliessend mit einem Hammer zerschlagen. Mit einer Bandsäge (Kolbe® Maschinenteknik GmbH, Elchingen, Deutschland) wurde unnötiges MMA entfernt und die Proben auf eine passende Grösse zugeschnitten. Anschliessend wurden die zugeschnittenen Proben in einer Sägevorrichtung (Exakt-Bandsäge, Typ 3031 PN, Ser.Nr.0221, exakt Apparatebau GmbH, Norderstedt, Deutschland) eingespannt und Dickschnitte hergestellt. Die Schnittebene verlief parallel zu einer gedachten Ebene durch die Procc. Spinosi und in einem 90° Winkel zu einer gedachten Ebene durch die Procc. Transversi. Es wurden 2 Schnittlokalisationen gewählt. Eine Ebene verlief direkt durch das Facettengelenk von L4/L5, die Zweite etwa 1-3 mm weiter lateral im Bereich der Basis der Transversalfortsätze (siehe Grafik 3.1).

Grafik 3.1: Schnittebenen

Die fertigen Schnitte wurden mit Wasser gereinigt, getrocknet und mindestens für 24 Stunden in Zellstoff verpackt und zwischen 2 Metallgewichten verwahrt getrocknet und geglättet. Danach wurde mit einem hochauflösenden Film (Fuji Photo Film Co.®, Ltd. Tokyo, Japan) eine Mikroradiographie im Faxitron (27KVp, 11s) angefertigt. Anschliessend wurden die Schnitte mit Schnellkleber (Cementit ® CA 12, Merz + Benteli AG, Niederwangen, Schweiz) auf weisse Acroplatten geklebt und beschriftet. Die Proben wurden zusätzlich zu der projektbezogenen Nummer noch mit einer Histologienummer gekennzeichnet. Dann wurden die Schnitte mit spezieller Schleif- und Poliermaschine (Exakt Mikroschleifsystem 400 CS, Exakt Aparatbau GmbH, Norderstedt, Deutschland) auf eine Dicke von 300µm abgeschliffen. Für die Oberflächenfärbung mit Toluidinblau wurden die Oberflächen der Schnitte 2 Mal

hintereinander für 2 Minuten mit 0,7%iger Ameisensäure geätzt und anschliessend 10-15 Minuten mit Toluidinlösung gefärbt. Ein Bild eines physiologischen Facettengelenks befindet sich im Anhang (Abb.25). Alle Schnitte wurden von 2 Personen unabhängig voneinander qualitativ beurteilt. Die definitive Beurteilung der einzelnen Schnitte ergab sich dann aus der Diskussion der beiden Betrachter. Im Rahmen dieser Beurteilung wurde zunächst die anatomische Lokalisation der Schnittebene makroskopisch bestimmt. Danach wurden die Schnitte anhand eines Mikroskops der Firma Leica (Leica® MDL 404097) bei 3 verschiedenen Vergrösserungen (1,25fach, 5fach, 10fach) histologisch beurteilt. Die histologische Beurteilung inkludierte die Beschreibung des neu gebildeten Knochengewebes (Geflechtknochen, trabekulärer Knochen) sowie die Schätzung der prozentualen Anteile beider Knochentypen am gesamten neu gebildeten Knochengewebe, die Beschreibung zellulärer Reaktionen im Rahmen des Knochenumbaus (Osteoblasten, Osteoklasten, mehrkernige Riesenzellen), die Beschreibung eventueller Entzündungsanzeichen und ihre Einteilung in akute und chronische Prozesse und die Beschreibung der Art der Knochenbildung (enchondral und/oder desmal). In Gruppe D wurde zusätzlich die Integration des Implantates beurteilt und die prozentualen Anteile des neugebildeten Knochens am Gesamtareal der Granula (Granula=100%) geschätzt.

Von Gruppe D der Hauptstudie wurden von den vorhandenen Proben zusätzlich Dünnschnitte angefertigt. Zu diesem Zweck wurde zunächst anhand einer mikroskopischen Durchsicht der fertigen Dickschnitte die „Region of Interest“ bestimmt (Regionen, in denen Zellschwärme sichtbar waren) und diese Zielregion an den Schnittresten eingezeichnet. Anschliessend wurde aus den Schnittresten der Blöcke jeder Probe ein etwa 1x2x0.5 cm grosses Stück aus dem eingezeichneten Bereich mittels Bandsäge (PROXXON® Typ MBS 230/§ NO 27170, Niersbach, Deutschland) separiert und einzeln in luftdichte, speziell angefertigte Teflonformen (massgefertigt von D.Nadler, Jossi AG, Islikon, Schweiz) verbracht. Anschliessend wurden die Formen mit Methylmethacrylat aufgegossen und mittels speziellen Deckeln luftdicht verschlossen. Die Polymerisation erfolgte innerhalb von 5 Tagen bei Raumtemperatur. Nach Aushärtung wurden Plastikrahmen aufgeklebt, die mit der Tiernummer und der Histologienummer beschriftet wurden. Danach wurde mittels Innenlochsäge der erste Schnitt angefertigt, um die bei der Einbettung entstandene „MMA-Kappe“ zu entfernen. Anschliessend wurden mittels Hartschnittmikrotom (Leica® RM 2155, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) drei 5-7 µm dünne Schnitte angefertigt.

Diese wurden anschliessend mit Methoxymethyl-acetat (Merck, Schweiz AG) entplastifiziert. Ein Dünnschnitt wurde danach mit Toluidinblau gefärbt und ein weiterer mit van Kossa mit McNeals Tetrachrom Gegenfärbung. Danach wurden alle Schnitte anhand eines Mikroskops der Firma Leica (Leica® MDL 404097) von 2 Personen unabhängig voneinander evaluiert. Die mit van Kossa gefärbten Schnitte wurden bei 20facher Vergrösserung bezüglich der prozentualen Anteile an Geflechtknochen und Bindegewebe beurteilt. Der Kalzifikationsgrad des neuen Knochengewebes wurde nach folgendem Scoresystem beurteilt:

Score	Kalzifikation
0	Nicht kalzifiziert
0,5	Zum Teil kalzifiziert
1	Kalzifiziert

Die semiquantitative Beurteilung der mit Toluidinblau gefärbten Schnitte erfolgte bei 40facher Vergrösserung nach folgendem Scoresystem:

Score	Absolute Anzahl der Zellen im Gesichtsfeld
0	0
1	1-5
2	6-10
3	> 11

Als Untersuchungsparameter wurden 4 verschiedene Zelltypen (mehrkernige Riesenzellen, Lymphozyten, Makrophagen, Plasmazellen) herangezogen und ihr Vorkommen in 3 unterschiedlichen Gesichtsfeldern subjektiv eingeschätzt. Der Mittelwert der 3 erfassten Ergebnisse für jeden Zelltyp stellte die Grundlage für das endgültige Scoring dar.

3.7 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten wurde mittels eines statistischen Programmes vorgenommen (SPSS 17.0.0 (2008), for Macintosh System X). Um Gesamtunterschiede zwischen den Gruppen zu ermitteln, wurde eine faktorielle Varianzanalyse (Factorial ANOVA) für die histologischen Daten und wiederholte Messungen (Repeated

Measures, ANOVA) für die Röntgenauswertung durchgeführt. Weiter wurden individuelle Unterschiede mit post hoc-Test nach Bonferoni ermittelt. Entsprechend wurden die Mittelwerte arithmetisch kalkuliert.

4 Resultate

4.1 Operation und postoperative Phase

Die Operationen verliefen mit Ausnahme von Schaf 4011 grösstenteils komplikationslos. Bei diesem Schaf wurde beim Setzen der cranialen Pedikelschraube auf der rechten Seite der Wirbelsäule der Wirbelkanal penetriert und das Rückenmark verletzt. Das Tier präsentierte sich postoperativ als festliegend. Nachdem sich eine Cortisonbehandlung und Vitamin B12 Therapie über mehrere Tage als nicht erfolgreich erwies wurde das Tier euthanasiert. Während der Operation war auffällig, dass dieses Schaf im Vergleich zu den Anderen wesentlich kleinere Wirbel aufwies, was das Einbringen der Schrauben deutlich erschwerte. Die Wirbel von Schaf 4019 waren ähnlich dimensioniert wie bei Schaf 4011. Die etwas zu langen Schrauben einer Seite gerieten beim Setzen mit denen der gegenüberliegenden Seite in Kontakt, was eine Schraubenrepositionierung notwendig machte. Die Schrauben mussten schlussendlich divergierend zueinander gesetzt werden, weshalb ein Anbiegen des Stabes notwendig war. Auf der linken Seite der Wirbelsäule traten dadurch Probleme beim Verbinden der Schrauben durch den Stab auf. Postoperativ präsentierte sich das Schaf aber klinisch und neurologisch unauffällig. Bei Schaf 4016 wurde das falsche Segment fusioniert (L5/L6). 4017 zeigte während der Operation eine stärkere Blutungsneigung als die anderen Schafe, was zum einen mit praeoperativen Stresszuständen, zum anderen mit der Schafrasse zusammenhängen kann (Funktionelle Faktor VIII Defizienz). Bei Schaf 4013 trat ein Materialfehler des Fibrinklebers auf. Trotz korrekter Mischung der 2 Komponenten des Klebers kam es zu keiner Polymerisation. Bei allen Schafen der Studie entwickelte sich postoperativ ein Serom im Bereich der Operationswunde, welches sich aber nach wenigen Tagen spontan resorbierte. Schaf 4008 wurde 2 Monate vor Beendigung der Präliminärstudie tot auf der Weide aufgefunden. L4/L5 wurden aber innerhalb von 2 Stunden entnommen, was für die Probenaufarbeitung durchaus vertretbar ist. Im Rahmen der pathologischen Untersuchung wurde der dringende Verdacht einer Infektion mit Listerien ausgesprochen. Weitere Zwischenfälle, die in

keinem direkten Zusammenhang mit der Operation aufgetreten sind waren ein Serom im Bereich der Vena jugularis (Schaf 4021), 2 Ausbrüche von Lippengrind (Schafe 4008 und 4010), eine Pneumonie (Schaf 4012), Pink eye (4002) und ein Abszess im Bereich der Nasenöffnung (4014). Alle aufgetretenen Erkrankungen sprachen auf die individuell gewählte Therapie gut an und beeinträchtigten das Tier in weiterer Folge nicht mehr. Ansonsten verlief die postoperative Phase bei allen Schafen der Studie unspektakulär. Im Rahmen der routinemässig durchgeführten klinischen und neurologischen Untersuchungen konnten keine pathologischen Abweichungen festgestellt werden. Eine Übersicht über die intra – und postoperativ aufgetretenen Probleme kann Tabelle 4.1 entnommen werden.

Tabelle 4.1: Übersicht über intraoperativen und postoperativen Probleme

Schafnummer	Gruppe	Problem intra/postoperativ
4002	A	Pink eye 10 Monate post OP
4008	B	Lippengrind 9 Monate post OP, Listeriose 10 Monate post OP, tot auf der Weide aufgefunden
4010	B	Lippengrind 9 Monate post OP
4011	B	Kleine Wirbel, Verletzung Rückenmark intraoperativ, Euthanasie
4012	B	Pneumonie 8 Monate post OP
4013	C	Materialfehler Fibrinkleber
4016	C	Segment L5/L6 fusioniert
4017	C	Starke Blutungsneigung intraoperativ
4019	C	Kleine Wirbel, Reposition der Pedikelschrauben auf der linken Seite nötig, divergierender Schraubenverlauf
4021	C	Serom im Bereich der Vena jugularis 9 Monate post OP
4014	D	Abszess Nasenöffnung 3 Monate post OP
Alle Schafe		Serom post OP

4.2 Ergebnisse der radiologische Beurteilung

4.2.1 Röntgen

Ein Problem bei der Beurteilung der obliquen Aufnahmen ergab sich aus einem oft unpassend gewählten Winkel, was eine Projektion des Stabes direkt in den Bereich der Facettengelenke zur Folge hatte. Aus diesem Grund konnte bei vielen Aufnahmen die Kontur der Gelenke und teilweise auch die Dichte der gelenkbildenden Strukturen nicht ermittelt werden. Ein wesentlich grösseres Problem die Beurteilung der Knochendichte betreffend ergab sich aber aus der Überlagerung des gesamten Gelenks oder von Teilen davon durch die dorsale Gasblase des Pansens oder durch gas - oder ingestagefüllte Darmteile (siehe Abb.22 im Anhang). Bei derartigen Aufnahmen enthielt man sich bezüglich der Beurteilung selbstverständlich jeglicher Aussage. In weit mehr als 50% der beurteilten Röntgenbilder war entweder in einem oder in beiden Facettengelenken des direkt angrenzenden Segments eine deutliche Fusion erkennbar. Diese war gekennzeichnet durch einen kompletten Konturverlust der gelenkbildenden Strukturen und durch massive knöcherne Zubildungen im Bereich der Gelenke. Diese Gelenkschalen waren in den cranial vom eigentlichen Fusionsbereich gelegenen Gelenken überrepräsentiert (siehe Abb.21 im Anhang).

Die grösste gemessene Subluxation von 5 mm war beim erstoperierten Tier (4001) zu verzeichnen. Die Häufigkeit und das Ausmass der Subluxationen verringerten sich mit jedem weiter folgenden Tier linear.

Im statistischen Vergleich der Knochendichte der Gruppe A und B konnte gezeigt werden, dass die Knochendichte in Gruppe A 16 Wochen nach der Operation geringer als die der cranialen Segmente erschien, sich aber mit 32 Wochen nach der Operation etwas dichter als physiologisch verhielt, um dann kontinuierlich bis zur 44. Woche wieder auf den Wert 1 zu fallen. In Gruppe B lagen die ermittelten Werte für die Knochendichte im Vergleich zur Gruppe A in der gesamten Studienzeit unter der physiologischen Dichte. Eine annähernd physiologische Dichte wurde lediglich in der 32. Woche nach der Operation erreicht. In der Zeit vor und nach diesem Peak bewegte sich die Knochendichte zwischen 1 und 2. Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen konnte in der 40. Woche festgestellt werden ($p=0.043$). Eine Tendenz für signifikante Unterschiede ergab sich auch in der 16. Woche ($p=0.063$), in der 28. Woche ($p=0.056$) und in der 44. Woche ($p=0.084$). In der 16. Woche lag die

Knochendichte der Negativkontrolle deutlich unter der Knochendichte der Positivkontrolle, in der 28. Woche deutlich darüber und in der 40. Und 44. Woche wieder deutlich darunter. Vergleicht man die Kurven beider Gruppen miteinander wird ersichtlich, dass sich die Knochendichte in Gruppe A im Rahmen der Studie deutlich verändert hat, während in Gruppe B keine grossen Abweichungen von einer leicht verminderten Knochendichte sichtbar waren.

Die Knochenkontur in Gruppe A war zu Beginn der Studie (4 Wochen) deutlich sichtbar, mit 16 Wochen waren keinerlei Konturen mehr zu sehen, mit 32 Wochen waren Konturen wieder teilweise erkennbar und von da an bis zum Ende der Studie (48 Wochen) waren die Konturen wieder gänzlich verschwommen. In Gruppe B waren die Knochenkonturen bereits zu Beginn der Studie (4 Wochen) nur mehr teilweise erkennbar, mit 36 Wochen schliesslich nicht mehr und bis zum Ende der Studie grossteils verschwommen erkennbar. Zwischen beiden Gruppen konnten die Knochenkontur betreffend keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Knochendichte in beiden Gruppen zwischen 28 und 36 Wochen einen Peak zeigte. In der 36. Woche konnte nachgewiesen werden, dass auch die Knochenkontur der gelenkbildenden Strukturen in beiden Gruppen aufgelöst bzw. verschwommen erkennbar war. Daher kann aus röntgenologischer Sicht eine Fusion in beiden Gruppen zwischen 7 und 9 Monaten anberaumt werden. Die Ergebnisse des RX – Scorings sind in den Tabellen 1a-k im Anhang angeführt. Die genauen Ergebnisse der statistischen Auswertung können Tabelle 4.1 entnommen werden. Die Ergebnisse sind zudem noch in Abbildung 4.1 und 4.2 veranschaulicht dargestellt.

Tab.4.1: Ergebnisse des RX – Scorings der Gruppen A und B der Vorstudie

Gruppe	Zeit (Wochen)	Knochenkontur	Knochendichte
A (Negativkontrolle)	4	0.89 ± 0.333	1.44 ± 0.527
	8	0.68 ± 0.462	1.50 ± 0.527
	12	0.54 ± 0.334	1.33 ± 0.492
	16	0.10 ± 0.211	1.00 ± 0.00
	20	0.31 ± 0.458	1.73 ± 0.467
	24	0.31 ± 0.458	1.45 ± 0.522
	28	0.30 ± 0.447	2.00 ± 0.00
	32	0.50 ± 0.378	2.08 ± 0.515
	36	0.14 ± 0.244	1.70 ± 0.675
	40	0.20 ± 0.350	1.25 ± 0.622
	44	0.28 ± 0.363	1.08 ± 0.289
	48	0.15 ± 0.242	1.45 ± 0.522
B (Positivkontrolle)	4	0.58 ± 0.376	1.29 ± 0.488
	8	0.42 ± 0.492	1.71 ± 0.488
	12	0.30 ± 0.422	1.63 ± 0.518
	16	0.30 ± 0.483	1.33 ± 0.500
	20	0.38 ± 0.443	1.43 ± 0.535
	24	0.33 ± 0.516	1.63 ± 0.744
	28	0.22 ± 0.441	1.56 ± 0.726
	32	0.19 ± 0.259	1.89 ± 0.601
	36	0.00 ± 0.00	1.67 ± 0.516
	40	0.17 ± 0.289	1.78 ± 0.441
	44	0.17 ± 0.289	1.60 ± 0.894
	48	0.13 ± 0.321	1.71 ± 0.756

Abb.4.1.: Auswertung der Knochendichte der Gruppen A und B

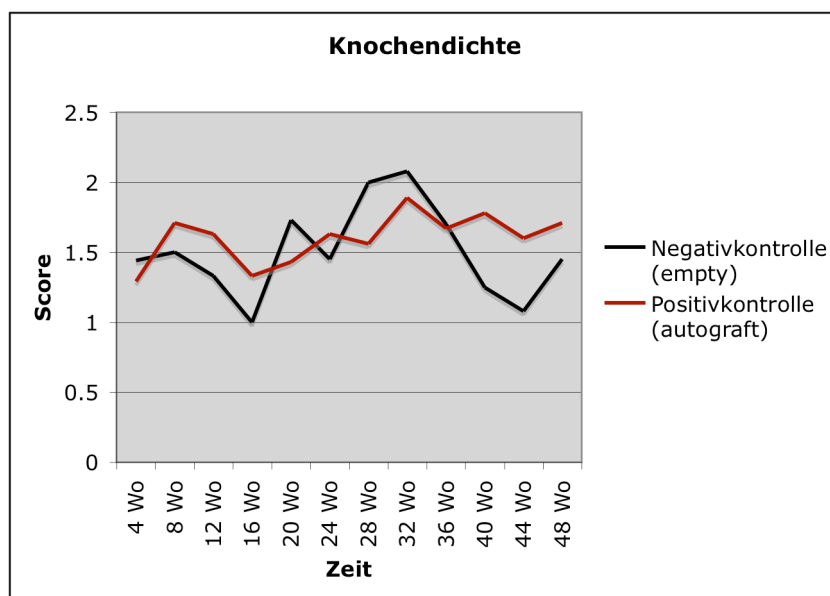
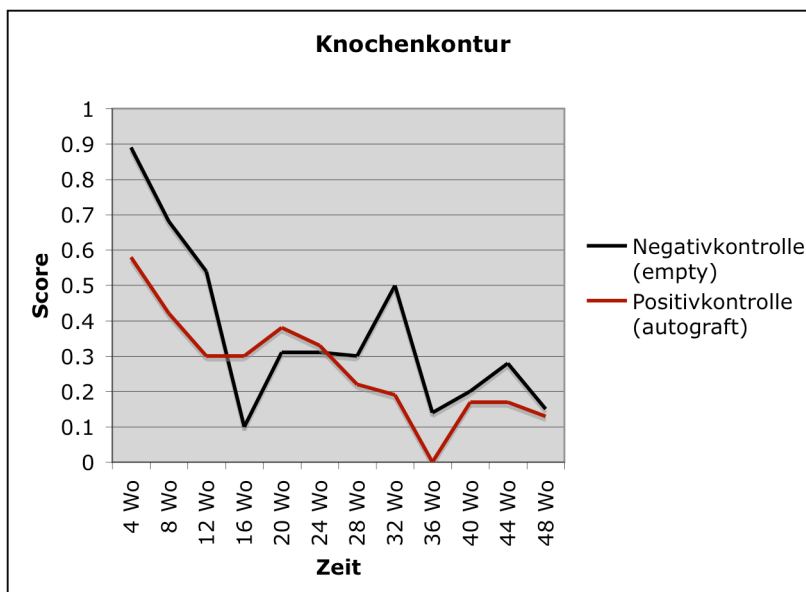


Abb.4.2.: Auswertung der Knochenkontur der Gruppen A und B

4.2.2 Computertomographie

Das Bildmaterial war von allen Schafen aller Gruppen, mit Ausnahme von Schaf 4008, welches durch bereits erwähntes Ableben 2 Monate vor Beendigung der Studie 40 und 44 Wochen nach der Operation nicht mehr computertomographisch untersucht werden konnte, vollständig vorhanden und konnte dem zu Folge einer Auswertung unterzogen werden. Die Bildqualität war bei vielen Aufnahmen als nicht zufrieden stellend einzustufen. Speziell bei Schaf 4004 war zum Zeitpunkt 24 Wochen nach der Operation eben Genannte derart schlecht, dass eine Beurteilung kaum durchzuführen war. Erschwerte Evaluierungskriterien ergaben sich auch bei Schaf 4014, bei dem zur Artefaktkorrektur statt dem Knochenalgorithmus lediglich der Weichteilalgorithmus verwendet wurde und bei den Bildern von Schaf 4019, bei denen die Auflösung extrem schlecht war. Durch die intraoperative Auffrischung des Facettengelenks waren einige Mikrofrakturen sichtbar, die sich zum Teil nur schwer vom eigentlichen Gelenkspalt differenzieren liessen. Ein weiteres Problem, welches sich ebenfalls im Zusammenhang mit eben erwähnten intraoperativen Manipulationen ergab, war, dass in manchen Segmenten Teile des Facettengelenkes komplett entfernt wurden und so eine Beurteilung des Gelenkspalts im Hinblick auf den Fusionsstatus nicht zur Gänze möglich war. Generell war zu beobachten, dass bei vielen Segmenten im Dorsalbereich

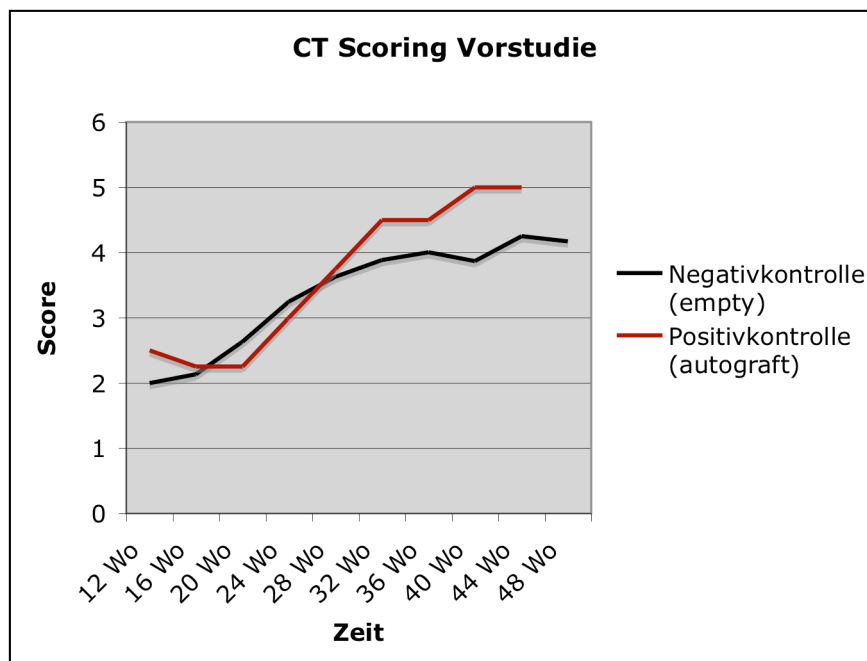
der Facettengelenke deutliche Fusionen zu erkennen waren, während der Gelenkspalt sich im Ventralbereich als unverändert präsentierte.

In Gruppe A konnte im linken Facettengelenk von Schaf 4002 eine Fusionsrate von über 80% 24 Wochen nach der Operation, im Rechten 32 Wochen nach der Operation festgestellt werden. Im linken Facettengelenk von Schaf 4004 wurde 36 Wochen postoperativ eine Fusionsrate von über 80% festgestellt, im Rechten konnte 36 Wochen nach der Operation lediglich eine Knochenüberbrückung von 61-80% erreicht werden. Schaf 4005 zeigte im linken Gelenk erst mit 44 Wochen eine unvollständige Fusion von 41-60%, im Rechten wurde mit 40 Wochen eine Fusionsrate von 61-80% erreicht. Das linke Facettengelenk von Schaf 4006 fusionierte 32 Wochen nach der Operation, das Rechte bereits nach 24 Wochen. In Gruppe B konnte im linken Facettengelenk von Schaf 4008 32 Wochen nach der Operation eine Fusionsrate von 41-60% festgestellt werden, im Rechten wurde eine annähernd vollständige Fusion von über 80% zum selben Zeitpunkt identifiziert. Beide Facettengelenke von Schaf 4010 fusionierten 24 Wochen nach der Operation zu über 80%. Die gesamten Scoreergebnisse der computertomographischen Beurteilung der Vorstudie sind der Tabelle 3 im Anhang zu entnehmen. Während dem gesamten Untersuchungszeitraum konnten zwischen beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Vergleicht man beide Gruppen der Vorstudie miteinander wird ersichtlich, dass die höchsten Fusionsraten in beiden Gruppen zwischen 40 und 44 Wochen erzielt wurden. In der Gruppe A (Negativkontrolle) wurde zu dieser Zeitspanne eine durchschnittliche Fusionsrate von 61-80% erreicht, in Gruppe B (Positivkontrolle) von > 80%. Die genauen Ergebnisse der statistischen Auswertung können Tabelle 4.2 entnommen werden. Die Ergebnisse sind zudem noch in Abbildung 4.3 veranschaulicht dargestellt

Tab. 4.2: Ergebnisse des CT-Scorings der Gruppe A und B der Vorstudie

Gruppe	Zeit (Wochen)	Fusionsstatus
A (Negativkontrolle)	12	2.00 ± 0.00
	16	2.13 ± 0.991
	20	2.63 ± 1.061
	24	3.25 ± 1.581
	28	3.63 ± 1.061
	32	3.88 ± 1.246
	36	4.00 ± 1.069
	40	3.87 ± 1.126
	44	4.25 ± 0.707
	48	4.17 ± 0.753
B (Positivkontrolle)	12	2.50 ± 0.577
	16	2.25 ± 0.957
	20	2.25 ± 1.500
	24	3.00 ± 2.309
	28	3.75 ± 1.258
	32	4.50 ± 1.000
	36	4.50 ± 1.000
	40	5.00 ± 0.000
	44	5.00 ± 0.000
	48	Daten nicht vorhanden

Abb.4.3.: Auswertung der CT- Scoring Ergebnisse der Gruppen A und B



12 Wochen nach der Operation konnte bei Schaf 4006 der Negativkontrolle in beiden Facettengelenken eine Fusionsrate von 21-40% ermittelt werden. Die Fusionsrate beider Facettengelenke von Schaf 4008 der Positivkontrolle verhielt sich zu diesem Zeitpunkt genauso. Bei Schaf 4010 der Positivkontrolle konnte 12 Wochen postoperativ in beiden Facettengelenken eine Fusionsrate von 41-60% festgestellt werden. Die gesamten Scoreergebnisse der computertomographischen Beurteilung der Vorstudie sind der Tabelle 3 im Anhang zu entnehmen.

In Gruppe C konnte 12 Wochen nach der Operation beim Grossteil der befundeten Segmente lediglich eine bilaterale Fusionsrate von 0-20% angegeben werden (4013, 4019, 4020, 4021). Bei Segment 4017 war das linke Facettengelenk zu 21-40% von neuem Knochenmaterial überbrückt und das Rechte zu 41-60%. Vom linken Facettengelenk des Segments 4027 waren 21-40% fusioniert, vom Rechte 0-20%. In Gruppe D stellte eine bilaterale Arthrodesse des Facettengelenks von 61-80% im Segment 4026 die beste Fusionsrate der Gruppe dar. In den Segmenten 4015, 4018 und 4025 wurde das linke Gelenk als 41-60% fusioniert beurteilt, das Rechte mit 21-40%. Das linke Facettengelenk von 4016 war nur zu 0-20% fusioniert, das Rechte zu 21-40%. Im Segment 4014 war der rechte Gelenkspalt zu 0-20% fusioniert, der Linke zu 21-40%. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass kein einziges Facettengelenk der Segmente der Hauptstudie 12 Wochen nach der Operation die Kriterien einer vollständigen Fusion erfüllte. Die gesamten Scoreergebnisse der computertomographischen Beurteilung der Hauptstudie sind der Tabelle 4 im Anhang zu entnehmen.

Nach 12 Wochen konnte in Gruppe A eine durchschnittliche Fusionsrate von 21-40% (Score 2) ermittelt werden, in Gruppe B (autologer Knochen) wurde nach 12 Wochen ebenfalls eine durchschnittliche Fusionsrate von etwa 21-40% (Score >2) erreicht. Vergleichend dazu wurde in Gruppe C (Fibrin+PTH) nach 12 Wochen mit einer Fusionsrate von 0-20% (Score >1) ein schlechteres Ergebnis erzielt als in den Gruppen A und B. In Gruppe D (Fibrin+MBCP+PTH) dagegen wurde nach 12 Wochen mit einer durchschnittlichen Fusionsrate von 21-40% (Score >2) ein besseres Ergebnis erzielt als in Gruppe C und ein Vergleichbares mit Gruppe A und B. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren mit $p=0.013$ signifikant. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung können folgender Tabelle entnommen werden:

Tab. 4.3: Auswertung der CT – Scoring Ergebnisse der Gruppen A, B, C und D zwölf Wochen nach der Operation

Gruppe	Zeit (Wochen)	Fusionsstatus
A (Negativkontrolle)	12	2.00 ± 0.00
B (Positivkontrolle)		2.50 ± 0.577
C (Fibrin+PTH)		1.33 ± 0.651
D (Fibrin+PTH+MBCP)		2.42 ± 0.996

4.2.3 Faxitron

Alle Bilder der Vorstudie mit Ausnahme der Aufnahme von Segment 4001 konnten in die Beurteilung miteinbezogen werden. Die Lendenwirbel des Schafes 4001 wurden in verkippten Zustand röntgenologisch erfasst, weshalb das rechte Facettengelenk weder die Kontur noch die Knochendichte betreffend beurteilt werden konnte. Die Knochenkontur war sowohl in den Segmenten der Negativkontrolle als auch in denen der Positivkontrolle komplett verschwommen und die Knochendichte stellte sich physiologisch dar. In manchen Segmenten konnten dicke Knochenbrücken gesehen werden, die sich an der Basis zwischen beiden Transversalfortsätze aufspannten (4009, 4010 links, 4012). In Gruppe C konnten alle Aufnahmen beurteilt werden. Die Ergebnisse die Knochenkontur betreffend verhielten sich in dieser Gruppe äusserst inhomogen und reichten von deutlich sichtbar über teilweise sichtbar bis komplett verschwommen. Die Knochendichte wurde bei allen Segmenten dieser Gruppe als physiologisch beurteilt. In Gruppe D konnten aufgrund der enormen Schattendichte der MBCP Residuen die Gelenke von 2 Proben (4014, 4015) überhaupt nicht beurteilt werden. In einer weiteren Probe waren nur Teile der Gelenke überlagert, weshalb zwar die Dichte, nicht aber die Kontur beurteilt werden konnte (4026). Die Knochendichte verhielt sich in allen der Beurteilung zugänglichen Proben physiologisch. Die Knochenkontur war in 2 Proben noch teilweise (4016, 4018) und in einer Probe nicht mehr sichtbar. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in Gruppe A und B der Pilotstudie nach einem Jahr eine komplette Auflösung der Kontur der gelenkbildenden Strukturen und eine physiologische Knochendichte zu beobachten war, was für eine

vollständige Fusion der Segmente spricht. In Gruppe C und D der Hauptstudie waren die gelenkbildenden Strukturen hauptsächlich verschwommen sichtbar, die Dichte wurde in allen Bildern als physiologisch angegeben. In beiden Gruppen wurde das Vorhandensein einer unvollständigen Fusion angenommen. Bei der statistischen Auswertung konnten weder in den beiden Gruppen der Vorstudie, noch in den beiden Gruppen der Hauptstudie signifikante Unterschiede festgestellt werden. Die Ergebnisse der Beurteilung der Faxitron – Bilder der Vor – und Hauptstudie können den Tabellen 6 und 7 im Anhang entnommen werden. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung können folgender Tabelle entnommen werden:

Tab. 4.4: Ergebnisse der Auswertung der Faxitron Bilder der Vor – und Hauptstudie

Gruppe	Zeit (Wochen)	Knochendichte	Knochenkontur
A (Negativkontrolle)	52	2.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
B (Positivkontrolle)	52	2.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
C (Fibrin+PTH)	16	2.00 ± 0.00	0.458 ± 0.50
D (Fibrin+PTH+MBCP)	16	2.00 ± 0.00	0.333 ± 0.50

4.3 Ergebnisse der makroskopischen Beurteilung der Segmente

Das Pedikelschraubensystem war bei allen Proben in situ. Bei keinem der Tiere konnten bei Adspektion der restlichen Wirbelsäule des Kadavers Deformationen oder pathologische Abweichungen, noch Anzeichen alter Blutungen oder Gefässschäden, beobachtet werden. In Gruppe A fiel auf, dass das Pedikelschraubensystem der meisten Proben dorsal nur von Weichteilen umgeben war. Neugebildeter Knochen reichte bis an die Ventralfläche der Stäbe. Nach Entfernung des Pedikelschraubensystems war eine Knochenrinne sichtbar, die sich unter den Stäben ausgebildet hatte (siehe Abb.19 im Anhang). Das Facettengelenk oder vielmehr der Gelenkspalt des intraoperativ aufgefrischten Gelenks war in keiner der Proben auffindbar. Bei 2 Tieren waren Knochenwülste an den Stabenden ausgebildet und die Verschlusskappen tief in Knochengewebe eingebettet (4002, 4006) Bei Schaf 4006 waren die Stabenden zusätzlich von einer etwa 1 mm dicken Knochenschicht bedeckt. Bei 2 Proben konnten die Schrauben nur unter grösster Krafteinwirkung und unter Zuhilfenahme einer

zweiten Person entfernt werden (4001, 4002), bei den restlichen Wirbeln wurde die Schrauben - Knochenverbindung als gut befundet (4003, 4004, 4005, 4006). Bei allen Proben, mit Ausnahme der Proben des Schafes 4006, wurde die Knochenmassenzunahme im Fusionsbereich als geringgradig beurteilt. Bei Schaf 4006 konnte keine Umfangsvermehrung im Fusionsbereich festgestellt werden. Die Facettengelenke waren in allen Proben fusioniert. In allen Proben der Gruppe A war auffällig, dass das Weichteilgewebe um das Pedikelschraubensystem bindegewebig derb und faserig ausgebildet war. Aus diesem Grund wurden bei 4004, 4005, 4006 und 4007 Gewebeproben für eine histologische Untersuchung entnommen. Zu diesem Zweck wurden die Proben in 4%iger neutral gepufferter Formalinlösung fixiert, mit Paraffin entwässert, imprägniert und eingebettet und anschliessend am Mikrotom in 2-5µm dicke Schnitte geschnitten. Diese wurden dann auf einen Glasobjektträger gezogen und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Bei 3 Segmenten konnte eine Penetration des ventralen Wirbelkörperkortex durch eine oder 2 Schrauben festgestellt werden (siehe Abb.16 im Anhang). Die Schraubenspitzen überragten die Knochenoberfläche auf einer Länge von 1 mm bis zu 1 cm (4001, 4003, 4006). Die dorsalen Flächen der Pedikelschraubensysteme in Gruppe B waren ähnlich wie die der Gruppe A ausschliesslich von Weichteilen umgeben. Auch die Ausbildung der Knochenrinne unter den Stäben war ähnlich wie in Gruppe A. Bei keiner der Proben konnte der Gelenkspalt des Facettengelenks gesehen werden. Ähnlich wie in Gruppe A waren bei 2 Proben der Gruppe B Knochenaufreibungen im Bereich der Stabenden ausgebildet und die Stabenden selbst von dünnen Knochenschichten umgeben (4010, 4012). Bei 2 Segmenten wurde die Knochenmassenzunahme beidseits als mittelgradig befundet (4007, 4012), bei weiteren 2 als geringgradig (4008, 4009). Bei Segment 4010 war eine mittelgradig vermehrte Knochenproliferation nur auf der rechten Seite zu beobachten. Auf der linken Seite verhinderte ein intraoperativ vergessener Tupfer jegliche Knochenneubildung und Fusion (siehe Abb.18 im Anhang). Alle anderen Facettengelenke dieser Gruppe wurden als fusioniert beurteilt. Die Schrauben/Knochenverbindung wurde in dieser Gruppe grösstenteils als gut befundet. Obwohl die Weichteile im Bereich des Pedikelschraubensystems in Gruppe B keinerlei auffällige Veränderungen aufwiesen wurden bei 3 Schafen (4007, 4009, 4012) Gewebeproben entnommen, um eine Vergleichsmöglichkeit für Gruppe A zu haben. In Gruppe C waren die Dorsalflächen des Pedikelsystems wie in Gruppe A und B von Weichteilen umgeben und keine gelenkbildenden Strukturen der Facettengelenke

sichtbar. Bei 2 Segmenten der Gruppe waren keine Knochenrinnen unter den Stäben ausgebildet, jedoch viel Knochengewebe im Bereich der Stabenden vorhanden (4013, 4017). In den Segmenten 4019, 4020, 4021 und 4027 waren Knochenwülste und Knochenrinnen ausgebildet und die Verschlusskappen waren tief in den Knochen eingebettet. Bei Probe 4019 waren die Schrauben und der Stab der linken Seite derart verbogen, dass eine Mobilisierung und Entfernung des Konstrukts nur sehr schwer möglich war. Gerade auf dieser Seite hatte sich mehr Knochen im Bereich des Facettengelenks neu gebildet als auf der anderen Segmentseite. Die Knochenmassenzunahme der linken Seite der Probe 4019 wurde daher als mittelgradig, die der Rechten als geringgradig beurteilt. Eine mittelgradige Knochenmassenzunahme im Bereich beider Facettengelenke waren in den Proben 4013, 4020 und 4021 zu verzeichnen, eine geringgradige Zunahme in den Proben 4017 und 4027. Die Facettengelenke dieser Gruppe wurden ebenfalls alle als fusioniert beurteilt. Die Schrauben - Knochenverbindung wurde mit mindergut bis gut bewertet. In Gruppe D waren die Dorsalflächen des Pedikelschraubensystems und die Rinnen medial und lateral der Stäbe von einer Mischung aus MBCP-Residuen, Faszienstrukturen und neu gebildetem Knochen bedeckt und ausgefüllt. Die Stabenden waren bei allen Proben mit Knochen bedeckt. Teilweise waren massive Knochenwülste ausgebildet, die die Entfernung der Stäbe erschwerten. Die Knochenmassenzunahme im Bereich der Facettengelenke wurde in den Proben 4014, 4016 und 4018 als hochgradig, in den Proben 4015, 4025 und 4026 als mittelgradig angegeben. Auch in dieser Gruppe wurden alle Facettengelenke als fusioniert beurteilt. Die Schrauben - Knochenverbindung wurde in allen Proben als gut bewertet. Im Rahmen der weiteren Verarbeitung aller beschriebenen Proben fiel bei genauerer Betrachtung der Schraubenlöcher auf, dass sich bei vielen Proben Implantatdebris im Kanal abgelagert hatte (siehe Abb.17 im Anhang). Die genauen Ergebnisse der makroskopischen Beurteilung können der Tabelle 5 im Anhang entnommen werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in allen Proben aller 4 Gruppen, mit Ausnahme der linken Seite der Probe 4010, aufgrund des Palpationsbefundes eine beidseitige Fusion der Facettengelenke vorhanden war. Im statistischen Vergleich beider Gruppen der Vorstudie konnte nachgewiesen werden, dass die Knochenmassenzunahme in Gruppe A (Negativkontrolle) statistisch signifikant höher war als in Gruppe B ($p=0.026$). Vergleicht man die beiden Gruppen der Hauptstudie die Knochenmassenzunahme betreffend wird deutlich, dass in Gruppe C signifikant

mehr neuer Knochen zugebildet wurde als in Gruppe D ($p= 0.00$). Die Ergebnisse der Auswertung können folgender Tabelle entnommen werden:

Tab. 4.5: Makroskopische Auswertung der Proben der Vor – und Hauptstudie

Gruppe	Zeit (Wochen)	Knochenmassenzunahme	Fusionsstatus
A (Negativkontrolle)	52	2.17 ± 0.389	2.00 ± 0.00
B (Positivkontrolle)	52	1.60 ± 0.699	1.80 ± 0.632
C (Fibrin+PTH)	16	1.42 ± 0.515	2.00 ± 0.00
D (Fibrin+PTH+MBCP)	16	0.50 ± 0.522	2.00 ± 0.00

4.4 Mikroradiographische Beurteilung

Die röntgendichten Areale in den Mikroradiographien entsprachen exakt den Toluidinblau gefärbten Knochenstrukturen der Dickschnitte. Die radioopake mikromakroporöse Kalziumphosphatkeramik der Gruppe D verhielt sich sowohl in den Dickschnitten, als auch in den Mikroradiographien wie Knochengewebe. Dicht gepackte Granula, die in den Dickschnitten als dunkelblau gefärbte Areale zwischen heller erscheinenden MBCP Residuen erschienen, zeigten sich röntgendichter als Areale der MBCP Granula, die sich in Resorption befanden. Auf eine gesonderte Evaluierung der Mikroradiographien wurde verzichtet.

4.5 Ergebnisse der histologischen Beurteilung

4.5.1 Qualitative Beurteilung der Dickschnitte

Neugebildeter Knochen war in allen Proben durch eine deutliche Zementlinie vom bereits bestehenden Knochen abgegrenzt. In Proben, in denen die Bandscheibe mit angeschnitten wurde, konnten vereinzelt Chondrone in der Bandscheibe beobachtet werden, was für eine Knorpelregeneration nach vorangegangener Schädigung spricht (siehe Abb.36 im Anhang). In manchen dieser Proben wurde dorsal der Bandscheibe ein Nerv angeschnitten, der in neu gebildetes Knochengewebe eingemauert war (siehe Abb.37 im Anhang). Oftmals konnten in den Proben angeschnittene Sehnen beobachtet

werden, die ihren Ursprung von einem der Transversalfortsätze oder vom Wirbelknochen nahmen. In diesem Fall konnte beobachtet werden, dass sich der neu gebildete Geflechtknochen immer in die Zugrichtung der Sehne entwickelte. Zum Teil konnten auch Anzeichen von Umbauvorgängen im Mutterknochen gesehen werden (Hohlzylinder mit frischem Osteoid und Osteoblastensaum, Lamellenknochen in Kalzifizierung). Generell kann gesagt werden, dass der Anteil an frischem Osteoid und die Anzahl der Osteoblasten entsprechend dem Anteil an juvenilem Knochen anstieg (siehe Abb.30 im Anhang). In vielen Proben konnten Knorpelinseln unterschiedlicher Dimension festgestellt werden, die grossteils im Begriff waren sich in Geflechtknochen zu differenzieren (siehe Abb.31 im Anhang). In manchen Proben, in denen zerstörte Gelenkanteile des Facettengelenks angeschnitten wurden, befanden sich diese Inseln sowohl in unmittelbarer Nähe zum Gelenk, als auch in einer gewissen Distanz dazu. Es konnte demzufolge nicht klar beurteilt werden, ob zum Teil durch die chirurgische Manipulation Knorpelanteile des Gelenks ins umliegende Gewebe zerstreut wurden oder ob es sich bei allen vorhandenen Inseln um Neubildungen handelte (siehe Abb.35 im Anhang).

Die Ergebnisse der histologischen Beurteilung der Gruppe A und B unterschieden sich lediglich im Geflecht- und Lamellenknochenanteil. In Gruppe A (Negativkontrolle) war wesentlich mehr Lamellenknochen als in Gruppe B (autologer Knochen) vorhanden (siehe Abb.29+30 im Anhang). Der neu gebildete Lamellenknochen in Gruppe A war zudem grossteils ausdifferenziert, während der vorhanden Lamellenknochen in Gruppe B juvenil erschien. In keiner der beiden Gruppen waren zelluläre Hinweise auf einen Entzündungsprozess zu finden. Neues Knochengewebe wurde im Bereich der Transversalfortsatzbasis immer in Richtung des zerstörten Facettengelenks zugebildet, was schlussendlich bei vielen Proben in der Ausbildung einer Knochenbrücke resultierte (siehe Abb.26,27 +28 im Anhang). Im Wirbelkörperbereich konnten neben Knochenbrücken auch neu gebildete Knochenareale entdeckt werden, deren Ursprung in keinem offensichtlichen Zusammenhang mit der Auffrischung des Gelenks zu sehen war. Grosse Geflechtknochenareale waren an den Rändern der Zubildungen zu sehen, während im Zentrum zumeist grossteils Lamellenknochen zu beobachten war. Viele Transversalfortsätze waren von einem Geflechtknochensaum umgeben. Aufgrund der vorhandenen Knorpelinseln konnte davon ausgegangen werden, dass sich neuer Knochen in Gruppe A und B über enchondrale Ossifikation bildete. Eine Verkalkung

umliegender Bindegewebsanteile im Sinne einer desmalen Ossifikation konnte in manchen Proben nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

In Gruppe C konnten in allen Proben zelluläre Anzeichen einer immunologischen Reaktion beobachtet werden (Plasmazellen, Lymphozyten, wenig Makrophagen). Im Vergleich zu den beiden Gruppen der Pilotstudie war der Anteil an frischem Osteoid und die Anzahl der Osteoblasten in den Hohlzylindern um ein Wesentliches grösser. Das neu gebildete Knochengewebe bestand zum Grossteil aus Geflechtknochen. Vorhandener Lamellenknochen erschien juvenil. Massive Knochenauf- und Umbauprozesse waren durch unregelmässige Geflechtknochenränder mit Ausziehungen ins Weichteilgewebe gekennzeichnet. Im Unterschied zu den Gruppen der Vorstudie waren in Gruppe C deutlich mehr Knorpelinseln, die im Begriff waren sich in Geflechtknochen zu differenzieren, zu beobachten (enchondrale Ossifikation). In Proben, in denen die Schraubenlöcher mit angeschnitten waren, konnten auch in den Schraubenlöchern Knorpelinseln gesehen werden.

In Gruppe D war der geringste Anteil an Lamellenknochen aller Gruppen zu verzeichnen (siehe Abb.32 im Anhang). Ähnlich wie in Gruppe C war der Anteil an frischem Osteoid und die Anzahl der Osteoblasten in den Hohlzylindern im Vergleich zu den Gruppen der Pilotstudie als sehr hoch einzustufen. In allen Proben waren noch grosse Mengen MBCP sichtbar. Die Granula selbst wies zum Teil deutliche Frakturlinien auf, speziell in Bereichen, in denen sich bereits Knochengewebe angelagert hatte (siehe Abb.33 im Anhang). Die Integration des Materials war als mässig einzustufen. Zum Teil lagerte sich neu gebildetes Knochengewebe direkt an die Granula an, zum Teil konnten jedoch deutliche Abstände zwischen Material und Knochen gesehen werden. In den meisten Proben wurde neuer Knochen vom Mutterknochen aus nachgebildet und wuchs dann von Mutterknochenrand ausgehend in die Granula ein (siehe Abb.34 im Anhang). Eigenständige Knocheninseln im Zentrum der Granula waren nur selten zu beobachten. Zwischen der Granula war fibrovaskuläres Gewebe nachzuweisen. Die deutliche Fibrose und das Vorhandensein von Kollagenfasern wiesen eindeutig auf eine desmale Ossifikation als Art der Knochenbildung hin. Mehrkernige Riesenzellen, Lymphozytenschwärme, Makrophagen und Plasmazellen waren als Zeichen einer immunologischen Reaktion zu werten.

Die genauen Ergebnisse der histologischen Beurteilung der Dickschnitte können den Tabellen 8-11 im Anhang entnommen werden.

4.5.2 Beurteilung der Dünnschnitte

In den mit Van Kossa gefärbten Schnitten der Gruppe D konnte wenig neu gebildeter Knochen, aber ein grosser Bindegewebsanteil nachgewiesen werden. Der neu gebildete Geflechtknochen war nur zu einem geringen Anteil kalzifiziert. In den mit Toluidinblau gefärbten Schnitten konnten verhältnismässig viele Makrophagen und Riesenzellen, aber nur wenige Lymphozyten und Plasmazellen nachgewiesen werden. Die Makrophagen waren im Begriff die Granula abzubauen, was deutlich an der Ansammlung derselben im Zytoplasma der Makrophagen zu erkennen war. Da nur von Gruppe D Dünnschnitte angefertigt wurden, konnte aus Mangel an Vergleichsmöglichkeiten auf eine statistische Auswertung verzichtet werden. Die genauen Ergebnisse der histologischen Beurteilung der Dünnschnitte können den Tabellen 12 und 13 im Anhang entnommen werden.

4.5.3 Beurteilung der Weichteilproben

In allen untersuchten Proben war eine massive Einlagerung von Fettgewebe zu verzeichnen. In Probe 4004 konnten sowohl zugrunde gegangene Muskelzellen als auch Muskelzellen in Regeneration nachgewiesen werden. Die Proben 4005 und 4006 wurden als physiologisch beurteilt. Bei 4007 waren wieder Anzeichen einer degenerativen Veränderung der Muskulatur zu sehen. In diesem Präparat gab es auch deutliche Anzeichen dafür, dass dieses zugrunde gehende Muskelgewebe direkt durch Fett ersetzt wird. In der Probe 4009 konnte zum einen ein kleiner Verkalkungsherd in der Muskulatur beobachtet werden, zum anderen die schon beschriebene Muskeldegeneration. Probe 4012 wurde als physiologisch bewertet. Eine Muskelatrophie im Zusammenhang mit der beobachteten Degeneration des Muskelgewebes konnte nicht definitiv ausgeschlossen werden (siehe Abb.38, 39 +40 im Anhang).

5 Diskussion

5.1 Operation und postoperative Phase

Bei 23 Schafen der Studie verlief die Operation und die postoperative Phase nahezu komplikationslos. Für ein Schaf (4011) endete die Operation aufgrund einer Penetration des Wirbelkanals und Verletzung des Rückenmarks letal. Das Schaf präsentierte sich nach der Operation als festliegend und musste schlussendlich nach erfolgloser Therapie euthanasiert werden. In der Humanmedizin zählen neurologische Ausfallserscheinungen zu den gefürchtetsten postoperativen Komplikationen. In der Literatur sind Komplikationsraten von 0,0 – 16,5 % angegeben. In vielen Fällen kommt es bei Humanpatienten entweder durch konservative Therapie oder durch einen erneuten chirurgischen Eingriff zu einer Besserung oder zu einer Totalrevision der Symptome. Die postoperativen Störungen reichen von Sensibilitätsstörungen, über Paresen bis hin zum Cauda equina Syndrom^{148, 173-175}. Die Ursache der Penetration des Wirbelkanals mit nachfolgender Lähmung der Hinterhand von Schaf 4011 waren in der zur Dimension der Schrauben verhältnismässig kleinen Dimension der Wirbel des Schafes zu sehen. Die Pedikel der Schaflendenwirbel sind ähnlich dimensioniert wie die der menschlichen Lendenwirbelkörper. Allerdings sind die Durchmesser der einzelnen Wirbel des Schafes kleiner als die des Menschen¹⁴⁴. Bei grossen Schafen stellt diese Tatsache ein vernachlässigbares Problem dar. Obgleich bei einigen Schafen bei der makroskopischen Beurteilung Schraubepenetrationen durch den posterioren Kortex zu beobachten waren, hatten diese klinisch gesehen keinerlei Relevanz. Die Wirbel von Schaf 4019 waren ähnlich dimensioniert wie bei Schaf 4011, weshalb intraoperativ Komplikationen auftraten. Die Schrauben der einen Seite gerieten beim Setzen mit denen der gegenüberliegenden Seite in Kontakt, weshalb eine Schraubenrepositionierung notwendig war und die Schrauben schlussendlich divergierend zueinander gesetzt werden mussten. Postoperativ präsentierte sich dieses Schaf aber klinisch und neurologisch unauffällig.

Die verwendeten Biomaterialien erwiesen sich in der Handhabung als benutzerfreundlich. Sie konnten komplikationslos in die gewünschten Bereiche appliziert werden und blieben auch während der weiteren Manipulationen in situ. Nur bei einem Schaf (4013) trat ein Materialfehler des Fibrinklebers auf. Trotz korrekter Mischung der 2 Komponenten kam es zu keiner Polymerisation. Die Ergebnisse des

Schafes 4013 waren jedoch nicht als abweichend zu den Ergebnissen der anderen Schafe der Gruppe C einzustufen, weshalb anzunehmen ist, dass das verwendete Material keinerlei Beeinträchtigung durch die fehlende Polymerisation des Fibrinklebers erfahren hat. Bei Schaf 4016 wurde das falsche Segment fusioniert (L5/L6). Diese Komplikation wird in der Humanmedizin nur als äusserst selten vorkommend beschrieben. Zur Vermeidung dieser Komplikation sollten die betroffenen Wirbel präoperativ markiert werden oder die Operation unter fluoroskopischer Kontrolle durchgeführt werden. Nachdem der Eingriff nicht aufgrund eines zugrunde liegenden Problems durchgeführt wurde, sondern gesunde Wirbel fusioniert wurden, fällt in diesem Fall die Fusion eines falschen Segments nicht so sehr ins Gewicht. Es wurde davon ausgegangen, dass sich die Bedingungen im Segment L4/L5 nicht so sehr von denen in L5/L6 unterscheiden, weshalb Schaf 4016 nicht von der Studie ausgeschlossen wurde. Betrachtet man abschliessend die Ergebnisse dieses Schafes im Vergleich mit denen der anderen Schafe der Gruppe C, kann diese Annahme durchaus bestätigt werden.

Bei allen anderen Schafen konnte im Zusammenhang mit der Operation keinerlei Probleme festgestellt werden. Die Operationen dauerten durchschnittlich 45 Minuten und die Tiere lagen etwa 60 Minuten in Narkose, was für einen patientenfreundlichen Eingriff spricht. Die Tiere bei denen Knochenmaterial aus der Crista iliaca entnommen wurde, wurden länger analgetisch abgedeckt. Bei keinem der Tiere konnten Veränderungen im Sinne einer erhöhten Schmerzhaftigkeit im Rahmen der täglichen Kontrollen beobachtet werden.

5.2 Radiologische Beurteilung

Auffällig im Rahmen der Beurteilung der Röntgenbilder der Vorstudie war die Tatsache, dass in weit mehr als 50% der beurteilten Bilder in einem oder beiden Facettengelenken des direkt angrenzenden Segments eine deutliche Fusion erkennbar war. Diese war gekennzeichnet durch einen kompletten Konturverlust der gelenkbildenden Strukturen und durch massive knöcherne Zubildungen im Bereich der Gelenke. Interessant war, dass diese Gelenkschalen gerade in den cranial vom eigentlichen Fusionsbereich gelegenen Gelenken überrepräsentiert waren. In der Humanmedizin sind Veränderungen in angrenzenden Segmenten als ASD (adjacent segment disease) beschrieben. Es handelt sich hierbei um eine Spätkomplikation der

Fusion, welche oft einen erneuten chirurgischen Eingriff notwendig macht. Die Arthrodesen führen zu biomechanischen Veränderungen in den benachbarten Segmenten, welche heute als die Hauptursache der ASD angesehen werden. Dazu zählen ein erhöhter Druck in den Bandscheiben, eine erhöhte Belastung der Facettengelenke und eine Hypermobilität der angrenzenden Segmente. Die röntgenologische Inzidenz der ASD liegt bei etwa 52-100%, die klinisch-symptomatische bei 5,2-18,5%. Die symptomatische ASD wird häufiger bei Patienten mit instrumentierter posterolateraler Fusion als uninstrumentierter oder bei anderen instrumentierten Methoden beobachtet¹⁴⁶. In der Humanmedizin werden Veränderungen sowohl in cranial als auch in caudal von der eigentlichen Fusionsstelle gelegenen Segmenten gefunden. Wie bereits erwähnt handelt es sich bei diesen Veränderungen eher um eine vermehrte Beweglichkeit, als um eine Versteifung^{146, 176}. Nachdem sich die Schaflendenwirbelsäule weder durch die Knochenheilungsbiologie, noch durch die Biomechanik grossartig von der menschlichen Wirbelsäule unterscheidet, bleibt als Ursache der Fusion im cranialen Segment im Schafmodell nur das quadrupede Gangbild des Schafes zu vermuten^{177 12-14, 144, 171, 172}. Eine weiterer Gedankenansatz, der auch das gehäufte Vorkommen im cranialen Segment erklären würde, ist in der Dissertation „Die Entstehung einer Nachbarsegmentdekompensation nach lumbaler Spondylodese. Einfluss des sagittalen Profils.“ von Stephan Noe zu finden. Beim Setzen der cranialen Pedikelschraube ist gelegentlich die teilweise Resektion des kaudalen Endes der nächsten cranialen Facettengelenkscapsel oder des Gelenks selbst erforderlich. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit von Degenerationen in diesem Bewegungssegment. Ein eventueller Grund für die Fusion im Rahmen der ASD im Schafmodell ist die Tatsache, dass eine ASD in angrenzenden Segmenten zu einer Osteoarthritis in den Facettengelenken führen kann. Die in der Literatur angegebenen Fusionszeiträume im Schafmodell liegen deutlich unter denen, die in Humanstudien angeführt werden. Durch die Zerstörung des Gelenkknorpels im Rahmen der Osteoarthritis wäre eine nachfolgende Fusion beim Schaf denkbar^{11, 178}.

Um den genauest möglichen Fusionszeitraum der Schafe der Vorstudie ermitteln zu können wurden sie monatlich über einen Zeitraum von einem Jahr röntgenologisch untersucht. Die Knochenkontur betreffend konnten zwischen beiden Gruppen der Vorstudie keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden. Mit 9 Monaten war die Knochenkontur der gelenkbildenden Strukturen in beiden Gruppen nicht mehr oder nur noch verschwommen erkennbar. Die Knochendichte betreffend konnte aber in der 40.

Woche ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen festgestellt werden ($p=0.043$). Eine Tendenz für signifikante Unterschiede ergab sich auch in der 16. Woche ($p=0.063$), in der 28. Woche ($p=0.056$) und in der 44. Woche ($p=0.084$). In der 16. Woche lag die Knochendichte der Negativkontrolle deutlich unter der Knochendichte der Positivkontrolle, in der 28. Woche deutlich darüber und in der 40. Und 44. Woche wieder deutlich darunter. Insgesamt erreichte die Knochendichte in beiden Gruppen zwischen 7 und 9 Monaten die höchsten Werte. Aufgrund dieser Ergebnisse ist eine röntgenologische Fusion in beiden Gruppen in einem Zeitraum von 7-9 Monaten anzuberaumen. Der Grund für die im Vergleich zur Positivkontrolle stark verminderte Knochendichte der Negativkontrolle zu Beginn der Studie kann dahingehend vermutet werden, dass zwar nach 7-9 Monaten in beiden Gruppen nahezu gleiche Fusionserfolge zu erzielen sind, die Anwendung von Knochenimplantaten im Rahmen der Positivkontrolle jedoch gerade im Anfangsstadium der Fusion die Ankylose mehr vorantreibt. Die abnehmende Knochendichte der subchondralen Knochenstrukturen bis zum Ende der Studie ist mit der verminderten Belastung der durch die Ankylose ruhiggestellten Gelenkstrukturen zu erklären¹⁷⁹.

Bei der Durchsicht und Beurteilung des computertomographischen Bildmaterials war auffällig, dass es offenbar durch die intraoperative Auffrischung der Facettengelenke zur Ausbildung von zahlreichen Mikrofrakturen gekommen war, die sich zum Teil nur schwer vom eigentlichen Gelenkspalt differenzieren liessen. Ein weiteres Problem, welches sich ebenfalls im Zusammenhang mit eben erwähnten intraoperativen Manipulationen ergab, war, dass in manchen Segmenten Teile des Facettengelenkes komplett entfernt wurden und so eine Beurteilung des Gelenkspalts im Hinblick auf den Fusionsstatus nicht zur Gänze möglich war.

Generell war zu beobachten, dass bei vielen Segmenten im Dorsalbereich der Facettengelenke deutliche Fusionen zu erkennen waren, während der Gelenkspalt sich im Ventralbereich als unverändert präsentierte. Die Facettengelenke verlaufen bogenförmig in einer obliquen Achse zur Sagittalebene¹⁸⁰. Nachdem der operative Eingriff von dorsal durchgeführt wird und die Facettengelenke daher auch von dorsal aufgefrischt werden, wäre es aufgrund der anatomischen Gegebenheiten der Facettengelenke möglich, dass intraoperativ lediglich die dorsalen Anteile des Gelenkknorpels entfernt werden, was eine schnellere Arthrodesse dieser Bereiche erklären würde¹⁸¹. Um die genauest möglichen Fusionszeitraum und die Fusionsrate bestimmen zu können wurden 6 Schafe der beiden Gruppen der Vorstudie (4 aus

Gruppe A und 2 aus Gruppe B) monatlich computertomographisch untersucht. Während dem gesamten Untersuchungszeitraum konnten zwischen beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden, was höchstwahrscheinlich der geringen Tierzahl zuzuschreiben ist. In beiden Gruppen der Vorstudie konnten die höchsten Fusionsraten zwischen 10 und 11 Monaten nach der Operation erzielt werden. In der Gruppe A (Negativkontrolle) wurde in dieser Zeitspanne eine durchschnittliche Fusionsrate von 61-80% erreicht, in Gruppe B (Positivkontrolle) von > 80%. Wie bereits erwähnt wurde der Fusionszeitraum nach Beurteilung der Röntgenbilder bereits zwischen 7 und 9 Monaten angesetzt. Die chirurgische Beurteilung stellt den Goldstandard in der Beurteilung der Fusion dar. Vergleicht man die röntgenologische Beurteilung mit der Chirurgischen, so kommt man auf eine Genauigkeit von 60-70%. Im Vergleich der computertomographischen Beurteilung mit der Chirurgischen wird von einer Genauigkeit von 80% berichtet¹⁸². Blumenthal und Gill stellten in ihrer Studie fest, dass der Fusionsgrad röntgenologisch im Vergleich zur chirurgischen Betrachtung meist unterbewertet wird. (Blumenthal 1993). Vergleicht man die röntgenologische Beurteilung aber mit der Computertomographischen, so wird der Fusionsstatus röntgenologisch überbewertet¹⁸³. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie, da der röntgenologische Fusionszeitraum früher angegeben wurde als der Computertomographische. Mittels Computertomographie ist eine präzisere Beurteilung der Strukturen des Facettengelenks möglich und zum Unterschied zur röntgenologischen Betrachtung kann mittels Computertomographie das gesamte Gelenk eingesehen werden. Aus diesem Grund können die Ergebnisse der computertomographischen Auswertung in der vorliegenden Studie als wahrscheinlicher angenommen werden. Wie bereits erwähnt wurden computertomographisch im Zeitraum von 11-12 Monate nach der Operation Fusionsraten von 61-80% (Negativkontrolle) und > 80% (Positivkontrolle) ermittelt. In der Humanmedizin konnten nach ähnlichem Untersuchungszeitraum Fusionsraten von 72-90% beschrieben werden^{2, 135, 155}. Obgleich aufgrund bereits publizierter Schafstudien anzunehmen war, dass in der Positivkontrolle des Schafmodells im Vergleich zum Menschen eine Fusion früher anzubereiten wäre und auch mit einer im Vergleich zum Menschen höheren Fusionsrate zu rechnen wäre, hat die vorliegende Studie im Schafmodell ziemlich ähnliche Ergebnisse erbracht wie die in der Humanmedizin Veröffentlichten¹¹. Implantatausfälle zählen zu den Hauptursachen der Pseudoarthrosenentwicklung im Rahmen der posterolateralen Fusion. In einer Studie von Kotani et al. konnte gezeigt

werden, dass sich die Entwicklung der Fusionsmasse positiv auf die Entlastung des Pedikelschraubensystems auswirkt. Zu Beginn der Arthrodesen wird die Stabilität im Segment rein durch das Instrumentarium übernommen. Je schneller die Fusion im Knochen reift, desto mehr Belastung kann das Segment selbst tragen und desto weniger kommt es zu einer Überlastung des Pedikelschraubensystems und zu Implantatausfällen. Deshalb ist gerade das Anfangsstadium der Fusion entscheidend für den endgültigen Fusionserfolg¹⁴⁴. Aus diesem Grund wurden die computertomographischen Ergebnisse der Gruppen der Vorstudie genauer betrachtet und anschliessend mit den computertomographischen Ergebnissen der beiden Gruppen der Hauptstudie verglichen. Nach 12 Wochen konnte in Gruppe A eine durchschnittliche Fusionsrate von 21-40% (Score 2) ermittelt werden, in Gruppe B (autologer Knochen) wurde nach 12 Wochen ebenfalls eine durchschnittliche Fusionsrate von etwa 21-40% (Score >2) erreicht. Vergleichend dazu wurde in Gruppe C (Fibrin+PTH) nach 12 Wochen mit einer Fusionsrate von 0-20% (Score >1) ein schlechteres Ergebnis erzielt als in den Gruppen A und B. In Gruppe D (Fibrin+MBCP+PTH) dagegen wurde nach 12 Wochen mit einer durchschnittlichen Fusionsrate von 21-40% (Score >2) ein besseres Ergebnis erzielt als in Gruppe C und ein Vergleichbares mit Gruppe A und B. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren mit $p=0.013$ signifikant. Obgleich zwischen Gruppe A und B im gesamten Studienverlauf keine signifikanten Unterschiede zu finden waren, wird bei Betrachtung der Ergebnisse 12 Wochen nach der Operation ersichtlich, dass die Anwendung von autologem Knochen gerade zu Beginn der Fusion einen positiven Effekt zu haben scheint. Autologer Knochen gilt als Goldstandard in der posterolateralen Fusion. Die Entnahme aus der Crista iliaca geht aber mit einer hohen Morbidität einher. Aus diesem Grund wird nach äquivalenten oder übergeordneten Alternativen gesucht. Betrachtet man nun die Ergebnisse der computertomographischen Untersuchung der Gruppen der Hauptstudie und vergleicht sie anschliessend mit denen der Vorstudie wird ersichtlich, dass in Gruppe D (Fibrin+PTH+MBCP) ein vergleichbares Ergebnis mit Gruppe B (Positivkontrolle) erzielt wurde. Diesem Ergebnis zur Folge wäre die Kombination aus Fibrin, PTH und MBCP eine denkbare Alternative zum autologen Knochen. Das gute Ergebnis dieser Gruppe muss allerdings ein wenig skeptisch betrachtet werden, da eine Unterscheidung zwischen physiologischem Knochen und dem kalziumphosphathältigen Implantat im Rahmen der computertomographischen Beurteilung nicht immer möglich ist.

Die Ergebnisse der Faxitronbeurteilung entsprechen den Ergebnissen der computertomographischen Untersuchungen. Demzufolge konnte in den Gruppen A und B nach 12 Monaten eine vollständige Fusion festgestellt werden, während die verschwommen erkennbaren Gelenkkonturen in den Gruppen C und D der Hauptstudie 4 Monate nach der Operation eher für eine unvollständige Fusion sprechen.

5.3 Makroskopische Beurteilung und Beurteilung der Weichteilproben

Das Pedikelschraubensystem war bei allen Proben in situ. Bei keinem der Tiere konnten bei Adspektion der restlichen Wirbelsäule des Kadavers Deformationen oder pathologische Abweichungen, noch Anzeichen alter Blutungen oder Gefäßschäden, beobachtet werden. Bei 3 Tieren konnten Schraubenperforationen des ventralen Wirbelkörperkortex festgestellt werden, wobei die Schraubenspitzen den Kortex bis zu einer Länge von 1 cm überragten. Der Grund dafür ist, dass die aus der Humanmedizin übernommenen Schrauben zu lang für die im Vergleich kleineren Wirbelkörper der Schafe sind¹⁷². In einigen Bohrlöchern konnte Implantatdebris gefunden werden. Dieser kann laut Literatur zu lokalen Entzündungsreaktionen führen, die wiederum zu einer Lockerung der Schrauben – Knochenverbindung beitragen. In weiterer Folge kann diese Lockerung zu einem Versagen des Pedikelschraubensystems führen und dadurch eine Fusion unterbinden. Die Schrauben – Knochenverbindung wurde bei den Tieren der Vorstudie nach einem Jahr als sehr gut bewertet und oftmals waren die Schrauben in diesen Gruppen nur durch stärksten Kraftaufwand zu entfernen. In den Gruppen der Hauptstudie wurde die Verbindung als gut bewertet, wobei keine der Schrauben ohne Instrumentarium entfernt hätte werden können. Folglich scheint das Vorhandensein von Implantatdebris in der vorliegenden Studie keinerlei Auswirkungen auf die Knochen – Schraubenverbindung gehabt zu haben^{149, 150}. Bei Lendenwirbelsegment 4010 verhinderte ein intraoperativ vergessener Tupfer auf der linken Seite jegliche Knochenneubildung. Die Verhinderung der Knochenneubildung ist einer Fremdkörperreaktion zuzuschreiben. Bei Probe 4019 waren die Schrauben und der Stab der linken Seite derart verbogen, dass eine Mobilisierung und Entfernung des Konstrukts nur sehr schwer möglich war. Interessant war allerdings, dass sich gerade auf dieser Seite mehr Knochen im Bereich des Facettengelenks neu gebildet hatte als auf der anderen Segmentseite. In einer Studie von Foster et al. wurde das Segment

L4/L5 im Schafmodell destabilisiert und anschliessend mit Pedikelschraubensystem fusioniert. Die Ergebnisse zeigten, dass es in der instabilen Gruppe verglichen mit der stabilen 12 Wochen nach der Operation zu mehr neuer Knochenbildung gekommen war. Neuer Knochen wurde über enchondrale Ossifikation zugebildet und es wurde vermutet, dass sich mechanische Kräfte im Bereich der Fusionsstelle positiv auf das Voranschreiten der enchondralen Ossifikation auswirkt und dass eine geringgradige, kontrollierte Instabilität offenbar dadurch zu einer vermehrten Knochenbildung führt. In der vorliegenden Studie wurden beide Facettengelenke aufgefrischt bevor das Segment L4/L5 mit Pedikelschraubensystem stabilisiert wurde. Nachdem das System bei Schaf 4019 auf der linken Seite durch das Verbiegen mit Sicherheit an Stabilität verloren hatte und im vorliegenden Modell in den Gruppen der Vorstudie und in Gruppe C der Hauptstudie enchondrale Ossifikation als Art der Knochenneubildung nachgewiesen wurde, liegt die Vermutung nahe, dass sich wie in der Studie von Foster et al. die Instabilität positiv auf die Knochenneubildung ausgewirkt hat¹⁶⁶.

In allen Proben der Gruppe A war auffällig, dass das Weichteilgewebe um das Pedikelschraubensystem bindegewebig derb und faserig ausgebildet war. Aus diesem Grund wurden bei 4004, 4005, 4006 und 4007 Gewebeproben für eine histologische Untersuchung entnommen. Obwohl die Weichteile im Bereich des Pedikelschraubensystems in Gruppe B keinerlei auffällige Veränderungen aufwiesen wurden bei 3 Schafen (4007, 4009, 4012) Gewebeproben entnommen, um eine Vergleichsmöglichkeit für Gruppe A zu haben.

In einigen der beurteilten Weichteilproben (4004, 4007, 4009) konnten degenerierte Muskelzellen und teilweise Muskelzellen in Regeneration nachgewiesen werden. In einer Arbeit von Suwa et al. wird die Muskelatrophie nach unterschiedlichen Lendenwirbelsäulenoperationen untersucht und es wird deutlich, dass diese nach einer posterolateralen Fusion mit medianem Zugang das schlimmste Ausmass annimmt. Als Ursachen der Atrophie der paraspinalen Muskulatur werden die lange intraoperative Retraktion der Paraspinalmuskeln, Verletzung von Muskelfasern, mechanische Zerstörung von Nerven und Gefässen, die die Muskulatur versorgen, Hitzeschäden durch die elektrische Koagulation und der postoperativ verminderte Muskelgebrauch nach der Arthrodesen des entsprechenden Segments, angesehen. Ein paramedianer Zugang wird als wesentlich vorteilhafter beschrieben, weil die Facettengelenke auch bei minimaler Retraktion zugänglich gemacht werden können und die Muskulatur in diesem Bereich auch stumpf präpariert werden kann¹⁸⁴. In der vorliegenden Studie

wurde ein medianer Zugang gewählt, welcher mit einem massiven Weichteiltrauma verbunden war. Die Degeneration der Muskelzellen in den Proben 4004, 4007 und 4009 ist daher nicht weiter verwunderlich. Interessant ist allerdings die Tatsache, dass in den Proben auch juvenile Muskelzellen zu finden sind, was für einen Regenerationsprozess spricht. Eine Regeneration ist nach Suwa et al. nur bei einer Atrophie durch den postoperativ verminderten Muskelgebrauch möglich. Den Schafen dieser Studie war es aufgrund der gewählten Operationstechnik sofort möglich sich nach der Operation frei zu bewegen, was sich förderlich auf den Muskelaufbau auswirkt. 3 weitere Proben wurden als physiologisch angesehen. Die enorme Fetteinlagerung in die Muskulatur korreliert mit dem guten Nährzustand der verwendeten Schafe.

In allen Proben aller 4 Gruppen, mit Ausnahme der linken Seite der Probe 4010, konnte aufgrund des Palpationsbefundes eine beidseitige Fusion der Facettengelenke festgestellt werden. Dieses Ergebnis korreliert in den Gruppen der Vorstudie mit den Ergebnissen der radiologischen Auswertung, die radiologischen Ergebnisse der Hauptstudie haben aber im Gegensatz zum Palpationsbefund auf eine unvollständige Fusion hingewiesen. Ein Grund dafür könnte zum Einen die subjektive Einschätzung des Palpationsbefundes durch eine Einzelperson sein, zum Anderen wird aber in einer Studie von Kanayama et al. auf die Diskrepanz zwischen biomechanischer, radiologischer und histologischer Bewertung des Fusionsstatus hingewiesen. In diesem Schafmodell konnte unter Anwendung der instrumentierten posterolateralen Fusion eine biomechanische Fusion 4-8 Wochen nach der Operation nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurde aufgrund der histologischen und computertomographischen Befunde eine Fusion nach 2 Monaten und aufgrund der röntgenologischen Befunde sogar erst nach 4 Monaten anberaumt. Histologisch wurde in der Fusionsmasse hauptsächlich undifferenzierter, nicht - mineralisierter Geflechtknochen nachgewiesen, der durch die verwendeten radiologischen Verfahren nicht darstellbar war. Aufgrund der ermittelten Befunde wurde die Vermutung aufgestellt, dass juveniler Knochen bereits im Anfangsstadium fähig ist eine stabile Fusion herzustellen und damit das Pedikelschraubensystem zu entlasten ¹⁷⁰. Überträgt man diese Erkenntnis auf die Ergebnisse der vorliegenden Studie kann davon ausgegangen werden, dass obwohl aus radiologischer und histologischer Sicht eine vollständige Fusion ausgeschlossen werden kann, dennoch eine zweckerfüllende biomechanische Fusion vorhanden ist. Im statistischen Vergleich beider Gruppen der Vorstudie konnte nachgewiesen werden, dass die Knochenmassenzunahme in Gruppe A (Negativkontrolle) statistisch signifikant

höher war als in Gruppe B ($p= 0.026$). Vergleicht man die beiden Gruppen der Hauptstudie die Knochenmassenzunahme betreffend wird deutlich, dass in Gruppe C signifikant mehr neuer Knochen zugebildet wurde als in Gruppe D ($p= 0.00$). Diese Erkenntnisse decken sich mit den Ergebnissen der qualitativen Beurteilung der Dickschnitte (siehe unter 5.4). Obgleich sich die Gruppen die Knochenmassenzunahme betreffend signifikant unterschieden, konnte den Fusionsstatus betreffend kein Unterschied erkannt werden. Daher wird davon ausgegangen, dass die Grösse der Fusionsmasse sich nicht direkt auf die Stabilität der Fusion auswirkt. Selbst die als geringgradig befundeten Knochenzubildungen waren ausreichend, um eine stabile Fusion zu gewährleisten.

5.4 Qualitative Beurteilung der Dickschnitte

Aufgrund der unterschiedlichen Grösse der Wirbelsegmente war es leider nicht möglich standardisierte Schnitte anzufertigen. Aus diesem Grund wurde neu gebildeter Knochen lediglich qualitativ, aber nicht quantitativ beurteilt. Der grösste Anteil an reifem Lamellenknochen war in den Gruppen A und B der Vorstudie 1 Jahr nach der Operation zu finden. In Gruppe C und D der Hauptstudie war der Geflechtknochenanteil 4 Monate nach der Operation deutlich überrepräsentiert. Der Anteil an neu gebildeten Knochen in den vorhandenen Schnitten wurde in den Gruppen der Vorstudie auch als deutlich geringer eingeschätzt als in der Hauptstudie. In Gruppe C und D konnten in allen Proben zelluläre Anzeichen einer immunologischen Reaktion auf das verwendete Biomaterial beobachtet werden (Plasmazellen, Lymphocyten, Makrophagen). Zellen, die auf einen akuten Entzündungsprozess hinweisen (Granulocyten), konnten in keiner der Proben festgestellt werden, was für die Einhaltung der sterilen Kautelen im Rahmen der Operation spricht. Interessant war, dass in vielen Schnitten immer wieder Chondrone in den Bandscheiben nachgewiesen werden konnten. Diese sprechen für eine Knorpelregeneration nach vorangegangener Schädigung. In der Humanmedizin wird von geschädigten Bandscheiben lediglich in den benachbarten Segmenten berichtet¹⁸⁵. Deutliche Knochenbrücken konnten nur in den Gruppen A, B und C nachgewiesen werden. In Gruppe D waren noch grosse Mengen MBCP sichtbar, was auf die physiologische Resorptionsstabilität der Kalziumphosphatgranula zurückzuführen ist⁵²⁻⁵⁴. Grossteils wurde neuer Knochen in Gruppe D vom Mutterknochen ausgehend nachgebildet, vereinzelt konnten aber auch isolierte Knocheninseln im Zentrum der

Granula nachgewiesen werden. Wie bereits erwähnt konnte durch die gewählten Schnittebenen das Gesamtausmass der neuen Knochenbildung nicht erfasst werden. In der makroskopischen Beurteilung konnten in Gruppe D aber teilweise massive Zubildungen, welche sich aus MBCP Residuen, neu gebildetem Knochen und Faszienstrukturen zusammensetzten, gesehen werden. Zudem weiss man, dass Hydroxyapatit eine hohe Stabilität der Keramik gewährleistet⁵²⁻⁵⁴. Obgleich der Anteil an Geflechtknochen in dieser Gruppe am höchsten war und der Anteil an neu gebildetem Knochen scheinbar am geringsten, kann davon ausgegangen werden, dass durch die Keramik und die Tatsache, dass eigentlich eine Verankerung derselben am Mutterknochen in jeder Probe nachzuweisen war, eine stabile, zweckdienende Fusion vorhanden war. Zudem konnte, wie bereits erwähnt, in einer Studie von Kanayama et al. gezeigt werden, dass undifferenzierter Geflechtknochen eine gute Stabilität der Fusion herstellen kann⁵⁴. In der Granula konnten teilweise deutliche Frakturlinien nachgewiesen werden. In einer Studie von Habibovic et al. wurden ebenfalls Frakturlinien in den Granula nachgewiesen, welche der hohen Mikroporosität der Granula zugeschrieben wurden. In den fakturierten Bereichen konnte kein neu gebildetes Knochengewebe nachgewiesen werden. In der vorliegenden Studie konnten Frakturlinien speziell in Bereichen, in denen sich neues Knochengewebe angelagert hatte, nachgewiesen werden. Der Grund weshalb sich die vorhandenen Mikrofrakturen in der vorliegenden Studie nicht negativ auf die Knochenbildung und – anlagerung ausgewirkt haben wird in der Kombination der Keramik mit Fibrin gesehen^{49, 51}. Das dreidimensionale Fibrinnetz verzweigt sich in den Poren der Keramiken und fördert durch Wachstumsfaktoren und angiogenetische Faktoren die Vaskularisation des Implantates und das Einwandern von Zellen. Ausserdem führt die Kombination von Keramiken mit Fibrinprodukten zu einer Verbesserung der mechanischen Stabilität und führt dadurch sekundär zu einer vermehrten Knochenbildung³¹. Obgleich die in der vorliegenden Studie verwendete Granula mit einer Partikelgrösse von 1-2mm, einer Mikroporosität von $< 10\ \mu\text{m}$ und einer Makroporosität von 300-600 μm gute Voraussetzungen für eine gute Integration der Granula erfüllte, wurde die Integration nur als mässig befundet. In vielen Lokalisationen konnte beobachtet werden, dass sich neuer Knochen in einer gewissen Entfernung zur Granula ablagerte. Le Guehenne zeigte in seiner Studie, dass sich bei Kombination von Fibrin mit MBCP neu gebildeter Knochen in einer schmalen Distanz zur Granula direkt auf das fibrilläre Netzwerk der Fibrinfäden anlagerte. Obgleich die osteoinduktive Wirkung von Fibrin nach wie vor

kontrovers diskutiert wird, bezeichnet le Gouhennec diese Art der Knochenablagerung als osteoinduktives Phänomen. Ausserem kam es in dieser Studie durch die Wirkung von Fibrin zu einem sehr guten Wachstum von neu gebildetem Knochen in die Tiefe des Implantates. Die durch Fibrin angelockten Fibroblasten produzieren extrazelluläre Kollagenmatrix, welche sich überall zwischen den Granula verteilt. Die Kollagenfasern dienen als Gerüst für einwandernde Knochenzellen und führen so zu einer tiefen Kolonisation des Implantates mit Knochengewebe. Wie bereits erwähnt konnte in der Gruppe D sowohl randständige als auch tiefe Kolonisation des Implantates beobachtet werden. In den Proben von Gruppe D konnte zum Unterschied zu den anderen Gruppen desmale Ossifikation als Art der Knochenbildung festgestellt werden. Gründe dafür werden unter „Beurteilung der Dünnschnitte“ diskutiert. In den Proben der 3 anderen Gruppen konnten Knorpelinseln unterschiedlicher Dimension festgestellt werden, die grossteils im Begriff waren sich in Geflechtknochen zu differenzieren. Besonders häufig waren diese Knorpelinseln in Gruppe C anzutreffen, was zum einen mit dem hohen Anteil an noch undifferenziertem Knochen zusammenhängt, zum zweiten mit dem osteoinduktiven Potential von PTH 1-34⁹⁴. Aufgrund dieser vorhandenen Knorpelinseln konnte davon ausgegangen werden, dass sich neuer Knochen in den Gruppen A, B und C über enchondrale Ossifikation ausbildet. Diese Tatsache ist nicht weiter verwunderlich. Die Stabilisierung eines Wirbelsegmentes, dessen Facettengelenk zerstört wurde, durch ein Pedikelschraubensystem ist annähernd mit einer unzureichenden Fixierung einer Fraktur eines langen Röhrenknochens vergleichbar. Hierbei bildet sich zunächst ein Frakturhämatom aus, welches sich durch Metaplasie in fibröses Gewebe und anschliessend in Knorpel umwandelt. Der vorhandene Knorpel differenziert sich dann in Knochen. Die Arthrodesen im Rahmen der posterolateralen Fusion heilt über eine kontrollierte heterotopische Knochenbildung. Das umliegende Weichteilgewebe bildet keine Wachstumsfaktoren, die eine Differenzierung des vorhandenen Zellmaterials in Knochengewebe begünstigen würden. Daher wird davon ausgegangen, dass beispielsweise autologer Knochen, als Träger von Wachstumsfaktoren, Knochenbildung im Weichteilgewebe induzieren kann¹⁶⁶. In der vorliegenden Studie konnte im Rahmen der histologischen Untersuchung gesehen werden, dass in Gruppe A (Negativkontrolle) der Vorstudie mehr ausdifferenzierter Lamellenknochen zu finden war als in Gruppe B (Positivkontrolle). Von niederen Spezies ist zwar bekannt, dass bereits eine Dekortizierung zu einer Fusion führen kann, im Schafmodell ist dieses Phänomen aber nicht beschrieben¹⁶⁵. Offenbar konnten in der

vorliegenden Studie durch die Auffrischung der Facettengelenke und die anschliessende Fixierung des Segments ohne Zugabe von ostoinduktiven Agentien im Schafmodell eine Fusion hergestellt werden. In der Literatur wird angenommen, dass die Fusionsergebnisse bei Verwendung von autologem Knochen dosisabhängig sind. Daher stellt die Verwendung von lokalem Knochenmaterial als Alternative zur Crista iliaca keine Lösung dar. Es kann spekuliert werden, dass im vorliegenden Schafmodell die unbeabsichtigt in situ belassenen, vom Facettengelenk losgelösten, Knochenpartikel ausreichend waren, Knochenbildung zu induzieren. In vielen Proben, so auch in denen der Gruppe A, konnten Knorpelinseln, die im Begriff waren sich in Knochen zu differenzieren, im direkten Umfeld des partiell zerstörten Facettengelenks gefunden werden. Die Vermutung, dass es sich hierbei um versprengte Facettengelenkanteile handelt, liegt nahe. In Gruppe C konnten vergleichbar zu den Gruppen A und B extrem viele Knorpelinseln angetroffen werden. Diese Tatsache spricht für offensichtlich vorhandenes osteoinduktive Potential von PTH 1-34. Interessant wäre ein histologischer Vergleich der beiden Gruppen der Hauptstudie mit beiden Gruppen der Vorstudie zum selben Tötungszeitpunkt. Die Durchführung dessen bleibt zukünftigen Studien vorbehalten.

5.5 Beurteilung der Dünnschnitte

In Gruppe D wurde Tricos (Tricos®, Baxter Healthcare S.A., Hertistrasse 2, CH-8304 Wallisellen), ein resorbierbares, bioaktives Knochenersatzstoff-Material, das allmählich durch neu gebildetes Knochengewebe ersetzt werden kann, eingesetzt. Es handelt sich um eine Zweiphasenkeramik aus Kalziumphosphat, bestehend aus 60% Hydroxyapatit und 40% Beta-Tri-Kalziumphosphat (β -TCP). Hydroxyapatit ist im Unterschied zu Trikalziumphosphat sehr resorptionsstabil und wird hauptsächlich über zelluläre Resorption abgebaut. Ein Nachteil von Trikalziumphosphat ist, dass es innerhalb von 6 – 18 Monaten durch Hydrolyse abgebaut und resorbiert wird und neuer Knochen nicht zeitlich analog dazu aufgebaut werden kann. Der schnelle Zerfall führt zu großen Volumenverlusten. Daher wird Trikalziumphosphat entweder in Kombination mit weniger schnell abbaubaren Materialien eingesetzt oder dient als Expander für autologes Knochenmaterial ¹⁹. In der Arbeit „Eine *in vivo* Studie über die Biokompatibilität und Resorption eines neuen Brushitekalziumphosphatzementes“ von Theiss et al., wird die zell – medierte Resorption von Kalziumphosphatzementen eingehend beschrieben. Sowohl Makrophagen, als auch Riesenzellen sind am

Resorptionsprozess von Knochenzementen beteiligt. Insbesondere Makrophagen weisen eine hohe Phagozytosekapazität für Kalziumphosphatpartikel auf und werden auch als Osteoklastenvorläuferzellen diskutiert. Die hohe Anzahl der Makrophagen und Riesenzellen in den Dünnschnitten der Gruppe D ist daher nicht weiter verwunderlich. Die wenigen Lymphozyten und Plasmazellen, die gefunden werden konnten, können als normale immunologische Antwort des Wirts auf das Implantat und als Teil der Heilung angesehen werden. Der hohe Bindegewebsanteil und die Kollagenfasern, die sowohl in den Dick – als auch in den Dünnschnitten der Gruppe D gefunden werden konnten sprechen für einen desmalen Ossifikationsprozess. Auch dieser Befund ist nicht verwunderlich, da sowohl bei ektopischer Implantation von Kalziumphosphatkeramiken in die Muskulatur von Hunden immunhistochemisch und histologisch gezeigt werden konnte, dass Osteoblastenvorläufer und neu geformtes knochenähnliches Gewebe Kollagentyp 1 exprimierten, als auch dass die Applikation von Kalziumphosphat in C2C12 Kulturen zu einer Expression von Cbfa1, einem essentiellen Transkriptionsfaktor der osteo-kartilaginären Zellreihe, von Kollagen Typ 1, von Knochen Sialoprotein, das wichtigste Strukturprotein der Knochenmatrix und von Osteokalzin führte^{186, 187}.

5.6 Perspektiven

In der vorliegenden Studie konnte die Eignung von PTH 1-34 als Alternative zur Verwendung von autologem Knochen im Rahmen der posterolateralen Fusion gezeigt werden. Ein Ziel dieser Studie war es den für den Fusionserfolg entscheidenden Anfangszeitraum genauer zu betrachten. Obgleich nur Gruppe C aus computertomographischer Sicht vergleichbare Ergebnisse mit der Positivkontrolle lieferte, konnten in der qualitativen histolgischen Untersuchung in beiden Gruppen deutliche Hinweise auf das osteoinduktive Potential von PTH 1-34 gefunden werden. Die vorhandenen Ergebnisse beweisen zum einen, dass PTH 1-34 auch in der posterolateralen Wirbelfusion osteoinduktives Potential aufweist und zeigen zum anderen, dass noch weitere Studien notwendig sind, um PTH 1-34 in der Wirbelsäulenchirurgie als Knochenersatzstoff zu etablieren.

6 Literaturverzeichnis

1. Reuler JB. Low back pain. *West J Med.* Aug 1985;143(2):259-265.
2. Christensen FB. Lumbar spinal fusion. Outcome in relation to surgical methods, choice of implant and postoperative rehabilitation. *Acta Orthop Scand Suppl.* Oct 2004;75(313):2-43.
3. Vaccaro AR, Patel T, Fischgrund J, et al. A pilot study evaluating the safety and efficacy of OP-1 Putty (rhBMP-7) as a replacement for iliac crest autograft in posterolateral lumbar arthrodesis for degenerative spondylolisthesis. *Spine.* Sep 1 2004;29(17):1885-1892.
4. Vaccaro AR, Whang PG, Patel T, et al. The safety and efficacy of OP-1 (rhBMP-7) as a replacement for iliac crest autograft for posterolateral lumbar arthrodesis: minimum 4-year follow-up of a pilot study. *Spine J.* May-Jun 2008;8(3):457-465.
5. Korovessis P, Koureas G, Zacharatos S, Papazisis Z, Lambiris E. Correlative radiological, self-assessment and clinical analysis of evolution in instrumented dorsal and lateral fusion for degenerative lumbar spine disease. Autograft versus coralline hydroxyapatite. *Eur Spine J.* Sep 2005;14(7):630-638.
6. Urrutia J, Thumm N, Apablaza D, Pizarro F, Zylberberg A, Quezada F. Autograft versus allograft with or without demineralized bone matrix in posterolateral lumbar fusion in rabbits. Laboratory investigation. *J Neurosurg Spine.* Jul 2008;9(1):84-89.
7. Smucker JD, Bobst JA, Petersen EB, Nepola JV, Fredericks DC. B2A peptide on ceramic granules enhance posterolateral spinal fusion in rabbits compared with autograft. *Spine.* May 20 2008;33(12):1324-1329.
8. Tortolani PJ, Park AE, Louis-Ugbo J, et al. The effects of doxorubicin (adriamycin) on spinal fusion: an experimental model of posterolateral lumbar spinal arthrodesis. *Spine J.* Nov-Dec 2004;4(6):669-674.
9. Jenis LG, Wheeler D, Parazin SJ, Connolly RJ. The effect of osteogenic protein-1 in instrumented and noninstrumented posterolateral fusion in rabbits. *Spine J.* May-Jun 2002;2(3):173-178.
10. Liao SS, Guan K, Cui FZ, Shi SS, Sun TS. Lumbar spinal fusion with a mineralized collagen matrix and rhBMP-2 in a rabbit model. *Spine.* Sep 1 2003;28(17):1954-1960.
11. Khan SN, Lane JM. Spinal fusion surgery: animal models for tissue-engineered bone constructs. *Biomaterials.* Apr 2004;25(9):1475-1485.
12. Drespe IH, Polzhofer GK, Turner AS, Grauer JN. Animal models for spinal fusion. *Spine J.* Nov-Dec 2005;5(6 Suppl):209S-216S.
13. Nuss KM, Auer JA, Boos A, von Rechenberg B. An animal model in sheep for biocompatibility testing of biomaterials in cancellous bones. *BMC Musculoskelet Disord.* 2006;7:67.
14. Steffen T, Marchesi D, Aebi M. Posterolateral and anterior interbody spinal fusion models in the sheep. *Clin Orthop Relat Res.* Feb 2000(371):28-37.
15. Biddulph SL. Bone donor site. Iliac crest or distal radius? *J Hand Surg [Br].* Dec 1999;24(6):645-646.
16. Bauer TW, Muschler GF. Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop Relat Res.* Feb 2000(371):10-27.
17. Schnürer SM GU, Kühn KD, Breusch SJ. Knochenersatzwerkstoffe. *Der Orthopäde.* 2003;32:2-10.

18. Rueger JM. [Bone substitution materials. Current status and prospects]. *Orthopade*. Feb 1998;27(2):72-79.
19. Moore WR, Graves SE, Bain GI. Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J Surg*. Jun 2001;71(6):354-361.
20. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science*. Nov 12 1965;150(698):893-899.
21. Urist MR, DeLange RJ, Finerman GA. Bone cell differentiation and growth factors. *Science*. May 13 1983;220(4598):680-686.
22. Urist MR, Silverman BF, Buring K, Dubuc FL, Rosenberg JM. The bone induction principle. *Clin Orthop Relat Res*. Jul-Aug 1967;53:243-283.
23. Friedenstein AY. Induction of bone tissue by transitional epithelium. *Clin Orthop Relat Res*. Jul-Aug 1968;59:21-37.
24. Reddi AH, Huggins C. Biochemical sequences in the transformation of normal fibroblasts in adolescent rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jun 1972;69(6):1601-1605.
25. Inanc B, Eser Elcin A, Koc A, Balos K, Parlar A, Murat Elcin Y. Encapsulation and osteoinduction of human periodontal ligament fibroblasts in chitosan-hydroxyapatite microspheres. *J Biomed Mater Res A*. Sep 15 2007;82(4):917-926.
26. Habibovic P, Gbureck U, Doillon CJ, Bassett DC, van Blitterswijk CA, Barralet JE. Osteoconduction and osteoinduction of low-temperature 3D printed bioceramic implants. *Biomaterials*. Mar 2008;29(7):944-953.
27. Yuan H, de Bruijn JD, Zhang X, van Blitterswijk CA, de Groot K. Bone induction by porous glass ceramic made from Bioglass (45S5). *J Biomed Mater Res*. May 1 2001;58(3):270-276.
28. Zaffe D. Some considerations on biomaterials and bone. *Micron*. 2005;36(7-8):583-592.
29. Duan YR, Zhang ZR, Wang CY, Chen JY, Zhang XD. Dynamic study of calcium phosphate formation on porous HA/TCP ceramics. *J Mater Sci Mater Med*. Sep 2005;16(9):795-801.
30. Ye F, Lu X, Lu B, et al. A long-term evaluation of osteoinductive HA/beta-TCP ceramics in vivo: 4.5 years study in pigs. *J Mater Sci Mater Med*. Nov 2007;18(11):2173-2178.
31. Le Nihouannen D, Saffarzadeh A, Gauthier O, et al. Bone tissue formation in sheep muscles induced by a biphasic calcium phosphate ceramic and fibrin glue composite. *J Mater Sci Mater Med*. Feb 2008;19(2):667-675.
32. Niedhart C, Maus U, Redmann E, Siebert CH. In vivo testing of a new in situ setting beta-tricalcium phosphate cement for osseous reconstruction. *J Biomed Mater Res*. Jun 15 2001;55(4):530-537.
33. Hsu YH, Turner IG, Miles AW. Fabrication and mechanical testing of porous calcium phosphate bioceramic granules. *J Mater Sci Mater Med*. Oct 2007;18(10):1931-1937.
34. Malard O, Bouler JM, Guicheux J, et al. Influence of biphasic calcium phosphate granulometry on bone ingrowth, ceramic resorption, and inflammatory reactions: preliminary in vitro and in vivo study. *J Biomed Mater Res*. Jul 1999;46(1):103-111.
35. LeGeros RZ. Biodegradation and bioresorption of calcium phosphate ceramics. *Clin Mater*. 1993;14(1):65-88.
36. Kasten P, Beyen I, Niemeyer P, Luginbuhl R, Böhner M, Richter W. Porosity and pore size of beta-tricalcium phosphate scaffold can influence protein

- production and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: An in vitro and in vivo study. *Acta Biomater.* Jun 11 2008.
37. Galois L, Mainard D. Bone ingrowth into two porous ceramics with different pore sizes: an experimental study. *Acta Orthop Belg.* Dec 2004;70(6):598-603.
 38. von Doernberg MC, von Rechenberg B, Bohner M, et al. In vivo behavior of calcium phosphate scaffolds with four different pore sizes. *Biomaterials.* Oct 2006;27(30):5186-5198.
 39. Lu JX, Flautre B, Anselme K, et al. Role of interconnections in porous bioceramics on bone recolonization in vitro and in vivo. *J Mater Sci Mater Med.* Feb 1999;10(2):111-120.
 40. dos Santos EA, Farina M, Soares GA, Anselme K. Surface energy of hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate ceramics driving serum protein adsorption and osteoblast adhesion. *J Mater Sci Mater Med.* Jun 2008;19(6):2307-2316.
 41. Silva SN, Pereira MM, Goes AM, Leite MF. Effect of biphasic calcium phosphate on human macrophage functions in vitro. *J Biomed Mater Res A.* Jun 15 2003;65(4):475-481.
 42. Heymann D, Pradal G, Benahmed M. Cellular mechanisms of calcium phosphate ceramic degradation. *Histol Histopathol.* Jul 1999;14(3):871-877.
 43. Wenisch S, Stahl JP, Horas U, et al. In vivo mechanisms of hydroxyapatite ceramic degradation by osteoclasts: fine structural microscopy. *J Biomed Mater Res A.* Dec 1 2003;67(3):713-718.
 44. Zyman Z, Glushko V, Dedukh N, Malyskhina S, Ashukina N. Porous calcium phosphate ceramic granules and their behaviour in differently loaded areas of skeleton. *J Mater Sci Mater Med.* May 2008;19(5):2197-2205.
 45. LeGeros RZ. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin Orthop Relat Res.* Feb 2002(395):81-98.
 46. Daculsi G, Laboux O, Malard O, Weiss P. Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics. *J Mater Sci Mater Med.* Mar 2003;14(3):195-200.
 47. Habibovic P, Sees TM, van den Doel MA, van Blitterswijk CA, de Groot K. Osteoinduction by biomaterials--physicochemical and structural influences. *J Biomed Mater Res A.* Jun 15 2006;77(4):747-762.
 48. Yuan H, Yang Z, Li Y, Zhang X, De Bruijn JD, De Groot K. Osteoinduction by calcium phosphate biomaterials. *J Mater Sci Mater Med.* Dec 1998;9(12):723-726.
 49. Habibovic P, Kruyt MC, Juhl MV, et al. Comparative in vivo study of six hydroxyapatite-based bone graft substitutes. *J Orthop Res.* Apr 10 2008.
 50. Habibovic P, Yuan H, van den Doel M, Sees TM, van Blitterswijk CA, de Groot K. Relevance of osteoinductive biomaterials in critical-sized orthotopic defect. *J Orthop Res.* May 2006;24(5):867-876.
 51. Le Nihouannen D, Saffarzadeh A, Aguado E, et al. Osteogenic properties of calcium phosphate ceramics and fibrin glue based composites. *J Mater Sci Mater Med.* Feb 2007;18(2):225-235.
 52. Arinzeh TL, Tran T, McAlary J, Daculsi G. A comparative study of biphasic calcium phosphate ceramics for human mesenchymal stem-cell-induced bone formation. *Biomaterials.* Jun 2005;26(17):3631-3638.
 53. Farina NM, Guzon FM, Pena ML, Cantalapiedra AG. In vivo behaviour of two different biphasic ceramic implanted in mandibular bone of dogs. *J Mater Sci Mater Med.* Apr 2008;19(4):1565-1573.

54. Kanayama M, Hashimoto T, Shigenobu K, Yamane S, Bauer TW, Togawa D. A prospective randomized study of posterolateral lumbar fusion using osteogenic protein-1 (OP-1) versus local autograft with ceramic bone substitute: emphasis of surgical exploration and histologic assessment. *Spine*. May 1 2006;31(10):1067-1074.
55. Bodde EW, Wolke JG, Kowalski RS, Jansen JA. Bone regeneration of porous beta-tricalcium phosphate (Conduit TCP) and of biphasic calcium phosphate ceramic (Biosel) in trabecular defects in sheep. *J Biomed Mater Res A*. Sep 1 2007;82(3):711-722.
56. Xie Y, Chopin D, Morin C, et al. Evaluation of the osteogenesis and biodegradation of porous biphasic ceramic in the human spine. *Biomaterials*. May 2006;27(13):2761-2767.
57. Guigui P, Hardouin P. [Histologic and biomechanic evaluation of posterolateral arthrodesis using a biphasic ceramic of calcium phosphate as bone substitute. Experimental study with sheep]. *Bull Acad Natl Med*. 2000;184(2):403-412; discussion 413-404.
58. Passuti N, Daculsi G, Rogez JM, Martin S, Bainvel JV. Macroporous calcium phosphate ceramic performance in human spine fusion. *Clin Orthop Relat Res*. Nov 1989(248):169-176.
59. Cavagna R, Daculsi G, Bouler JM. Macroporous calcium phosphate ceramic: a prospective study of 106 cases in lumbar spinal fusion. *J Long Term Eff Med Implants*. 1999;9(4):403-412.
60. Fujibayashi S, Shikata J, Tanaka C, Matsushita M, Nakamura T. Lumbar posterolateral fusion with biphasic calcium phosphate ceramic. *J Spinal Disord*. Jun 2001;14(3):214-221.
61. Theoret CL. The pathophysiology of wound repair. *Vet Clin North Am Equine Pract*. Apr 2005;21(1):1-13.
62. Amrani DL, Diorio JP, Delmotte Y. Wound healing. Role of commercial fibrin sealants. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;936:566-579.
63. Le Guehennec L, Layrolle P, Daculsi G. A review of bioceramics and fibrin sealant. *Eur Cell Mater*. 2004;8:1-10; discussion 10-11.
64. Soffer E, Ouhayoun JP, Anagnostou F. Fibrin sealants and platelet preparations in bone and periodontal healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. May 2003;95(5):521-528.
65. Krishnan LK, Vijayan Lal A, Uma Shankar PR, Mohanty M. Fibrinolysis inhibitors adversely affect remodeling of tissues sealed with fibrin glue. *Biomaterials*. Jan 2003;24(2):321-327.
66. Abiraman S, Varma HK, Umashankar PR, John A. Fibrin glue as an osteoinductive protein in a mouse model. *Biomaterials*. Jul 2002;23(14):3023-3031.
67. Bagot D'Arc M, Daculsi G. Micro macroporous biphasic ceramics and fibrin sealant as a moldable material for bone reconstruction in chronic otitis media surgery. A 15 years experience. *J Mater Sci Mater Med*. Mar 2003;14(3):229-233.
68. Bieli M. [Does fibrin glue accelerate wound healing? An autoradiography study of bone defects]. *Helv Chir Acta*. Jun 1993;59(5-6):797-801.
69. Bluteau G, Pilet P, Bourges X, et al. The modulation of gene expression in osteoblasts by thrombin coated on biphasic calcium phosphate ceramic. *Biomaterials*. May 2006;27(15):2934-2943.

-
70. Carmagnola D, Berglundh T, Lindhe J. The effect of a fibrin glue on the integration of Bio-Oss with bone tissue. A experimental study in labrador dogs. *J Clin Periodontol*. May 2002;29(5):377-383.
 71. Dare EV, Vascotto SG, Carlsson D, Hincke MT, Griffith M. Differentiation of a fibrin gel encapsulated chondrogenic cell line. *Int J Artif Organs*. Jul 2007;30(7):619-627.
 72. Kania RE, Meunier A, Hamadouche M, Sedel L, Petite H. Addition of fibrin sealant to ceramic promotes bone repair: long-term study in rabbit femoral defect model. *J Biomed Mater Res*. Spring 1998;43(1):38-45.
 73. Le Guehennec L, Goyenvallée E, Aguado E, et al. MBCP biphasic calcium phosphate granules and tissucol fibrin sealant in rabbit femoral defects: the effect of fibrin on bone ingrowth. *J Mater Sci Mater Med*. Jan 2005;16(1):29-35.
 74. Le Nihouannen D, Guehennec LL, Rouillon T, et al. Micro-architecture of calcium phosphate granules and fibrin glue composites for bone tissue engineering. *Biomaterials*. May 2006;27(13):2716-2722.
 75. Lucht U, Bunker C, Moller JT, Joyce F, Plenk H, Jr. Fibrin sealant in bone transplantation. No effects on blood flow and bone formation in dogs. *Acta Orthop Scand*. Feb 1986;57(1):19-24.
 76. Nakamura K, Koshino T, Saito T. Osteogenic response of the rabbit femur to a hydroxyapatite thermal decomposition product-fibrin glue mixture. *Biomaterials*. Oct 1998;19(20):1901-1907.
 77. Oberg S, Kahnberg KE. Combined use of hydroxy-apatite and Tisseel in experimental bone defects in the rabbit. *Swed Dent J*. 1993;17(4):147-153.
 78. Ono K, Shikata J, Shimizu K, Yamamuro T. Bone-fibrin mixture in spinal surgery. *Clin Orthop Relat Res*. Feb 1992(275):133-139.
 79. Pilliar RM, Lee JM, Maniopoulos C. Observations on the effect of movement on bone ingrowth into porous-surfaced implants. *Clin Orthop Relat Res*. Jul 1986(208):108-113.
 80. Arrighi I, Mark S, Alvisi M, von Rechenberg B, Hubbell JA, Schense JC. Bone healing induced by local delivery of an engineered parathyroid hormone prodrug. *Biomaterials*. Jan 3 2009.
 81. Bhang SH, Jeon O, Choi CY, Kwon YH, Kim BS. Controlled release of nerve growth factor from fibrin gel. *J Biomed Mater Res A*. Mar 15 2007;80(4):998-1002.
 82. Breen A, Strappe P, Kumar A, O'Brien T, Pandit A. Optimization of a fibrin scaffold for sustained release of an adenoviral gene vector. *J Biomed Mater Res A*. Sep 15 2006;78(4):702-708.
 83. Ehrbar M, Zeisberger SM, Raeber GP, Hubbell JA, Schnell C, Zisch AH. The role of actively released fibrin-conjugated VEGF for VEGF receptor 2 gene activation and the enhancement of angiogenesis. *Biomaterials*. Apr 2008;29(11):1720-1729.
 84. Han D, Liu W, Ao Q, Wang G. Optimal delivery systems for bone morphogenetic proteins in orthopedic applications should model initial tissue repair structures by using a heparin-incorporated fibrin-fibronectin matrix. *Med Hypotheses*. Jun 17 2008.
 85. Martino MM, Mochizuki M, Rothenfluh DA, Rempel SA, Hubbell JA, Barker TH. Controlling integrin specificity and stem cell differentiation in 2D and 3D environments through regulation of fibronectin domain stability. *Biomaterials*. Feb 2009;30(6):1089-1097.
-

86. Schense JC, Bloch J, Aebischer P, Hubbell JA. Enzymatic incorporation of bioactive peptides into fibrin matrices enhances neurite extension. *Nat Biotechnol.* Apr 2000;18(4):415-419.
87. Swieszkowski W, Tuan BH, Kurzydowski KJ, Hutmacher DW. Repair and regeneration of osteochondral defects in the articular joints. *Biomol Eng.* Nov 2007;24(5):489-495.
88. Thomopoulos S, Zaegel M, Das R, et al. PDGF-BB released in tendon repair using a novel delivery system promotes cell proliferation and collagen remodeling. *J Orthop Res.* Oct 2007;25(10):1358-1368.
89. Walpoth BH, Zammaretti P, Cikirikcioglu M, et al. Enhanced intimal thickening of expanded polytetrafluoroethylene grafts coated with fibrin or fibrin-releasing vascular endothelial growth factor in the pig carotid artery interposition model. *J Thorac Cardiovasc Surg.* May 2007;133(5):1163-1170.
90. Wang SS, Yang MC, Chung TW. Liposomes/chitosan scaffold/human fibrin gel composite systems for delivering hydrophilic drugs--release behaviors of tirofiban in vitro. *Drug Deliv.* Mar-Apr 2008;15(3):149-157.
91. Zhao W, Han Q, Lin H, et al. Improved neovascularization and wound repair by targeting human basic fibroblast growth factor (bFGF) to fibrin. *J Mol Med.* Jun 11 2008.
92. Potts JT. Parathyroid hormone: past and present. *J Endocrinol.* Dec 2005;187(3):311-325.
93. Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature.* May 15 2003;423(6937):349-355.
94. Poole KE, Reeve J. Parathyroid hormone - a bone anabolic and catabolic agent. *Curr Opin Pharmacol.* Dec 2005;5(6):612-617.
95. Pettway GJ, Meganck JA, Koh AJ, Keller ET, Goldstein SA, McCauley LK. Parathyroid hormone mediates bone growth through the regulation of osteoblast proliferation and differentiation. *Bone.* Apr 2008;42(4):806-818.
96. Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Roberson P, Parfitt AM, Manolagas SC. Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone. *J Clin Invest.* Aug 1999;104(4):439-446.
97. Onyia JE, Helvering LM, Gelbert L, et al. Molecular profile of catabolic versus anabolic treatment regimens of parathyroid hormone (PTH) in rat bone: an analysis by DNA microarray. *J Cell Biochem.* May 15 2005;95(2):403-418.
98. Dobnig H, Turner RT. Evidence that intermittent treatment with parathyroid hormone increases bone formation in adult rats by activation of bone lining cells. *Endocrinology.* Aug 1995;136(8):3632-3638.
99. Dempster DW, Cosman F, Kurland ES, et al. Effects of daily treatment with parathyroid hormone on bone microarchitecture and turnover in patients with osteoporosis: a paired biopsy study. *J Bone Miner Res.* Oct 2001;16(10):1846-1853.
100. Lane NE, Sanchez S, Modin GW, Genant HK, Pierini E, Arnaud CD. Parathyroid hormone treatment can reverse corticosteroid-induced osteoporosis. Results of a randomized controlled clinical trial. *J Clin Invest.* Oct 15 1998;102(8):1627-1633.
101. Khosla S, Amin S, Orwoll E. Osteoporosis in men. *Endocr Rev.* Jun 2008;29(4):441-464.
102. Lippuner K. Medical treatment of vertebral osteoporosis. *Eur Spine J.* Oct 2003;12 Suppl 2:S132-141.

103. Greenspan SL, Bone HG, Ettinger MP, et al. Effect of recombinant human parathyroid hormone (1-84) on vertebral fracture and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis: a randomized trial. *Ann Intern Med.* Mar 6 2007;146(5):326-339.
104. Jodar-Gimeno E. Full length parathyroid hormone (1-84) in the treatment of osteoporosis in postmenopausal women. *Clin Interv Aging.* 2007;2(1):163-174.
105. Maugeri D, Russo E, Luca S, et al. Changes of the quality-of-life under the treatment of severe senile osteoporosis with teriparatide. *Arch Gerontol Geriatr.* Jun 12 2008.
106. Rizzoli R. Osteoporosis: non-hormonal treatment. *Climacteric.* Oct 2007;10 Suppl 2:74-78.
107. Talalaj M, Marcinowska-Suchowierska E. The use of parathyroid hormone in the treatment of osteoporosis. *Ortop Traumatol Rehabil.* Aug 31 2006;8(4):372-379.
108. Girotra M, Rubin MR, Bilezikian JP. The use of parathyroid hormone in the treatment of osteoporosis. *Rev Endocr Metab Disord.* Jun 2006;7(1-2):113-121.
109. Lundkvist J, Johnell O, Cooper C, Sykes D. Economic evaluation of parathyroid hormone (PTH) in the treatment of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporos Int.* Feb 2006;17(2):201-211.
110. Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, et al. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med.* May 10 2001;344(19):1434-1441.
111. Nozaka K, Miyakoshi N, Kasukawa Y, Maekawa S, Noguchi H, Shimada Y. Intermittent administration of human parathyroid hormone enhances bone formation and union at the site of cancellous bone osteotomy in normal and ovariectomized rats. *Bone.* Jan 2008;42(1):90-97.
112. Gardner MJ, van der Meulen MC, Carson J, et al. Role of parathyroid hormone in the mechanosensitivity of fracture healing. *J Orthop Res.* Nov 2007;25(11):1474-1480.
113. Nakazawa T, Nakajima A, Shiomi K, Moriya H, Einhorn TA, Yamazaki M. Effects of low-dose, intermittent treatment with recombinant human parathyroid hormone (1-34) on chondrogenesis in a model of experimental fracture healing. *Bone.* Nov 2005;37(5):711-719.
114. Skripitz R, Bohling S, Ruther W, Aspenberg P. Stimulation of implant fixation by parathyroid hormone (1-34)-A histomorphometric comparison of PMMA cement and stainless steel. *J Orthop Res.* Nov 2005;23(6):1266-1270.
115. Lawrence JP, Ennis F, White AP, et al. Effect of daily parathyroid hormone (1-34) on lumbar fusion in a rat model. *Spine J.* Jul-Aug 2006;6(4):385-390.
116. Abe Y, Takahata M, Ito M, Irie K, Abumi K, Minami A. Enhancement of graft bone healing by intermittent administration of human parathyroid hormone (1-34) in a rat spinal arthrodesis model. *Bone.* Nov 2007;41(5):775-785.
117. Whitfield JF. Parathyroid hormone: a novel tool for treating bone marrow depletion in cancer patients caused by chemotherapeutic drugs and ionizing radiation. *Cancer Lett.* Nov 28 2006;244(1):8-15.
118. Arrighi I, Mark S, von Rechenberg B, Hubbel JA, Schense J. Bone healing induced by local delivery of a PTH 1-34 fusion peptide. *53rd Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society.* 2007.
119. Fuerst A, Derungs S, von Rechenberg B, Auer JA, Schense J, Watson J. Use of a parathyroid hormone peptide (PTH(1-34))-enriched fibrin hydrogel for the treatment of a subchondral cystic lesion in the proximal interphalangeal joint of

- a warmblood filly. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* Mar 2007;54(2):107-112.
120. Bonadio J, Smiley E, Patil P, Goldstein S. Localized, direct plasmid gene delivery in vivo: prolonged therapy results in reproducible tissue regeneration. *Nat Med.* Jul 1999;5(7):753-759.
121. Fang J, Zhu YY, Smiley E, et al. Stimulation of new bone formation by direct transfer of osteogenic plasmid genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jun 11 1996;93(12):5753-5758.
122. Chen H, Frankenburg EP, Goldstein SA, McCauley LK. Combination of local and systemic parathyroid hormone enhances bone regeneration. *Clin Orthop Relat Res.* Nov 2003(416):291-302.
123. Van Tomme SR, Storm G, Hennink WE. In situ gelling hydrogels for pharmaceutical and biomedical applications. *Int J Pharm.* May 1 2008;355(1-2):1-18.
124. Jung RE, Cochran DL, Domken O, et al. The effect of matrix bound parathyroid hormone on bone regeneration. *Clin Oral Implants Res.* Jun 2007;18(3):319-325.
125. Jung RE, Hammerle CH, Kokovic V, Weber FE. Bone regeneration using a synthetic matrix containing a parathyroid hormone peptide combined with a grafting material. *Int J Oral Maxillofac Implants.* Mar-Apr 2007;22(2):258-266.
126. Liu X, Pettway GJ, McCauley LK, Ma PX. Pulsatile release of parathyroid hormone from an implantable delivery system. *Biomaterials.* Oct 2007;28(28):4124-4131.
127. Jeon JH, Puleo DA. Alternating release of different bioactive molecules from a complexation polymer system. *Biomaterials.* May 30 2008.
128. Blumenthal SL, Ohnmeiss DD. Intervertebral cages for degenerative spinal diseases. *Spine J.* Jul-Aug 2003;3(4):301-309.
129. Parker LM, Murrell SE, Boden SD, Horton WC. The outcome of posterolateral fusion in highly selected patients with discogenic low back pain. *Spine.* Aug 15 1996;21(16):1909-1916; discussion 1916-1907.
130. Baramki HG, Steffen T, Lander P, Chang M, Marchesi D. The efficacy of interconnected porous hydroxyapatite in achieving posterolateral lumbar fusion in sheep. *Spine.* May 1 2000;25(9):1053-1060.
131. Guigui P, Plais PY, Flautre B, et al. Experimental model of posterolateral spinal arthrodesis in sheep. Part 2. Application of the model: evaluation of vertebral fusion obtained with coral (Porites) or with a biphasic ceramic (Triosite). *Spine.* Dec 15 1994;19(24):2798-2803.
132. Walsh WR, Harrison J, Loeffler A, et al. Mechanical and histologic evaluation of Collagraft in an ovine lumbar fusion model. *Clin Orthop Relat Res.* Jun 2000(375):258-266.
133. Burkus JK. Re: Kim DH, Jahng TA, Fu T-S, et al. Evaluation of HealosMP52 osteoinductive bone graft for instrumented lumbar intertransverse process fusion in sheep. *Spine* 2004;29;2800-8. *Spine.* Jun 1 2005;30(11):1342-1343; author reply 1343-1344.
134. Sandhu HS, Toth JM, Diwan AD, et al. Histologic evaluation of the efficacy of rhBMP-2 compared with autograft bone in sheep spinal anterior interbody fusion. *Spine.* Mar 15 2002;27(6):567-575.
135. Greenough CG, Peterson MD, Hadlow S, Fraser RD. Instrumented posterolateral lumbar fusion. Results and comparison with anterior interbody fusion. *Spine.* Feb 15 1998;23(4):479-486.

136. Soegaard R, Bunger CE, Christiansen T, Hoy K, Eiskjaer SP, Christensen FB. Circumferential fusion is dominant over posterolateral fusion in a long-term perspective: cost-utility evaluation of a randomized controlled trial in severe, chronic low back pain. *Spine*. Oct 15 2007;32(22):2405-2414.
137. Christensen FB, Hansen ES, Eiskjaer SP, et al. Circumferential lumbar spinal fusion with Brantigan cage versus posterolateral fusion with titanium Cotrel-Dubousset instrumentation: a prospective, randomized clinical study of 146 patients. *Spine*. Dec 1 2002;27(23):2674-2683.
138. Polly DW, Jr., Santos ER, Mehbod AA. Surgical treatment for the painful motion segment: matching technology with the indications: posterior lumbar fusion. *Spine*. Aug 15 2005;30(16 Suppl):S44-51.
139. Meij BP, Suwankong N, Van der Veen AJ, Hazewinkel HA. Biomechanical flexion-extension forces in normal canine lumbosacral cadaver specimens before and after dorsal laminectomy-discectomy and pedicle screw-rod fixation. *Vet Surg*. Dec 2007;36(8):742-751.
140. Synthes. Axon System; 2003.
141. Synthes. Pangea System für degenerative Erkrankungen der Wirbelsäule. 2006.
142. Synthes. USS Universal Spine System; 2007.
143. Synthes. Products: Wirbelsäule. 2007.
144. Kotani Y, Cunningham BW, Cappuccino A, Kaneda K, McAfee PC. The role of spinal instrumentation in augmenting lumbar posterolateral fusion. *Spine*. Feb 1 1996;21(3):278-287.
145. Lonstein JE, Denis F, Perra JH, Pinto MR, Smith MD, Winter RB. Complications associated with pedicle screws. *J Bone Joint Surg Am*. Nov 1999;81(11):1519-1528.
146. Park P, Garton HJ, Gala VC, Hoff JT, McGillicuddy JE. Adjacent segment disease after lumbar or lumbosacral fusion: review of the literature. *Spine*. Sep 1 2004;29(17):1938-1944.
147. Cheh G, Bridwell KH, Lenke LG, et al. Adjacent segment disease following lumbar/thoracolumbar fusion with pedicle screw instrumentation: a minimum 5-year follow-up. *Spine*. Sep 15 2007;32(20):2253-2257.
148. Gaines RW, Jr. The use of pedicle-screw internal fixation for the operative treatment of spinal disorders. *J Bone Joint Surg Am*. Oct 2000;82-A(10):1458-1476.
149. Cunningham BW, Orbegoso CM, Dmitriev AE, et al. The effect of spinal instrumentation particulate wear debris. an in vivo rabbit model and applied clinical study of retrieved instrumentation cases. *Spine J*. Jan-Feb 2003;3(1):19-32.
150. Hallab NJ, Cunningham BW, Jacobs JJ. Spinal implant debris-induced osteolysis. *Spine*. Oct 15 2003;28(20):S125-138.
151. Schatzker J, Waddell J, Stoll JE. The effects of motion on the healing of cancellous bone. *Clin Orthop Relat Res*. Aug 1989(245):282-287.
152. Tokuhashi Y, Matsuzaki H, Oda H, Uei H. Clinical course and significance of the clear zone around the pedicle screws in the lumbar degenerative disease. *Spine*. Apr 15 2008;33(8):903-908.
153. Sanden B, Olerud C, Petren-Mallmin M, Johansson C, Larsson S. The significance of radiolucent zones surrounding pedicle screws. Definition of screw loosening in spinal instrumentation. *J Bone Joint Surg Br*. Apr 2004;86(3):457-461.

154. Kakkos SK, Shepard AD. Delayed presentation of aortic injury by pedicle screws: Report of two cases and review of the literature. *J Vasc Surg.* May 2008;47(5):1074-1082.
155. Blumenthal SL, Gill K. Can lumbar spine radiographs accurately determine fusion in postoperative patients? Correlation of routine radiographs with a second surgical look at lumbar fusions. *Spine.* Jul 1993;18(9):1186-1189.
156. Lee MJ, Kim S, Lee SA, et al. Overcoming artifacts from metallic orthopedic implants at high-field-strength MR imaging and multi-detector CT. *Radiographics.* May-Jun 2007;27(3):791-803.
157. Kanayama M, Cunningham BW, Seftor JC, et al. Does spinal instrumentation influence the healing process of posterolateral spinal fusion? An in vivo animal model. *Spine.* Jun 1 1999;24(11):1058-1065.
158. Guigui P, Plais PY, Flautre B, et al. Experimental model of posterolateral spinal arthrodesis in sheep. Part 1. Experimental procedures and results with autologous bone graft. *Spine.* Dec 15 1994;19(24):2791-2797.
159. Zdeblick TA. A prospective, randomized study of lumbar fusion. Preliminary results. *Spine.* Jun 15 1993;18(8):983-991.
160. Kornblatt MD, Casey MP, Jacobs RR. Internal fixation in lumbosacral spine fusion. A biomechanical and clinical study. *Clin Orthop Relat Res.* Feb 1986(203):141-150.
161. Kleiner JB, Odom JA, Jr., Moore MR, Wilson NA, Huffer WE. The effect of instrumentation on human spinal fusion mass. *Spine.* Jan 1 1995;20(1):90-97.
162. Fischgrund JS, Mackay M, Herkowitz HN, Brower R, Montgomery DM, Kurz LT. 1997 Volvo Award winner in clinical studies. Degenerative lumbar spondylolisthesis with spinal stenosis: a prospective, randomized study comparing decompressive laminectomy and arthrodesis with and without spinal instrumentation. *Spine.* Dec 15 1997;22(24):2807-2812.
163. Tokuhashi Y, Ajiro Y, Umezawa N. Follow-up of patients with delayed union after posterior fusion with pedicle screw fixation. *Spine.* Apr 1 2008;33(7):786-791.
164. Boden SD. The biology of posterolateral lumbar spinal fusion. *Orthop Clin North Am.* Oct 1998;29(4):603-619.
165. Ludwig SC, Boden SD. Osteoinductive bone graft substitutes for spinal fusion: a basic science summary. *Orthop Clin North Am.* Oct 1999;30(4):635-645.
166. Foster MR, Allen MJ, Schoonmaker JE, et al. Characterization of a developing lumbar arthrodesis in a sheep model with quantitative instability. *Spine J.* Jul-Aug 2002;2(4):244-250.
167. Slater R, Nagel D, Smith RL. Biochemistry of fusion mass consolidation in the sheep spine. *J Orthop Res.* 1988;6(1):138-144.
168. Cunningham BW, Shimamoto N, Seftor JC, et al. Osseointegration of autograft versus osteogenic protein-1 in posterolateral spinal arthrodesis: emphasis on the comparative mechanisms of bone induction. *Spine J.* Jan-Feb 2002;2(1):11-24.
169. Cook SD, Dalton JE, Prewett AB, Whitecloud TS, 3rd. In vivo evaluation of demineralized bone matrix as a bone graft substitute for posterior spinal fusion. *Spine.* Apr 15 1995;20(8):877-886.
170. Kanayama M, Cunningham BW, Weis JC, Parker LM, Kaneda K, McAfee PC. Maturation of the posterolateral spinal fusion and its effect on load-sharing of spinal instrumentation. An in vivo sheep model. *J Bone Joint Surg Am.* Nov 1997;79(11):1710-1720.

171. Wilke HJ, Kettler A, Claes LE. Are sheep spines a valid biomechanical model for human spines? *Spine*. Oct 15 1997;22(20):2365-2374.
172. Kettler A, Liakos L, Haegele B, Wilke HJ. Are the spines of calf, pig and sheep suitable models for pre-clinical implant tests? *Eur Spine J*. Dec 2007;16(12):2186-2192.
173. Pihlajamäki H, Myllynen P, Bostman O. Complications of transpedicular lumbosacral fixation for non-traumatic disorders. *J Bone Joint Surg Br*. Mar 1997;79(2):183-189.
174. Wenger M, Sapio N, Markwalder TM. Long-term outcome in 132 consecutive patients after posterior internal fixation and fusion for Grade I and II isthmic spondylolisthesis. *J Neurosurg Spine*. Mar 2005;2(3):289-297.
175. Schoenecker PL, Cole HO, Herring JA, Capelli AM, Bradford DS. Cauda equina syndrome after in situ arthrodesis for severe spondylolisthesis at the lumbosacral junction. *J Bone Joint Surg Am*. Mar 1990;72(3):369-377.
176. Chou WY, Hsu CJ, Chang WN, Wong CY. Adjacent segment degeneration after lumbar spinal posterolateral fusion with instrumentation in elderly patients. *Arch Orthop Trauma Surg*. Feb 2002;122(1):39-43.
177. Easley NE, Wang M, McGrady LM, Toth JM. Biomechanical and radiographic evaluation of an ovine model for the human lumbar spine. *Proc Inst Mech Eng [HJ]*. Aug 2008;222(6):915-922.
178. Oda I, Cunningham BW, Buckley RA, et al. Does spinal kyphotic deformity influence the biomechanical characteristics of the adjacent motion segments? An in vivo animal model. *Spine*. Oct 15 1999;24(20):2139-2146.
179. Trouillier H, Kern P, Refior HJ, Müller-Gerbl M. A prospective morphological study of facet joint integrity following intervertebral disc replacement with the CHARITE Artificial Disc. *Eur Spine J*. Feb 2006;15(2):174-182.
180. Carrera GF, Haughton VM, Syvertsen A, Williams AL. Computed tomography of the lumbar facet joints. *Radiology*. Jan 1980;134(1):145-148.
181. Stick Aa. Equine Surgery. second edition;chapter 72(Arthrodesis techniques).
182. Carreon LY, Djurasovic M, Glassman SD, Sailer P. Diagnostic accuracy and reliability of fine-cut CT scans with reconstructions to determine the status of an instrumented posterolateral fusion with surgical exploration as reference standard. *Spine*. Apr 15 2007;32(8):892-895.
183. Guigui P, Barre E, Benoist M, Deburge A. Radiologic and computed tomography image evaluation of bone regrowth after wide surgical decompression for lumbar stenosis. *Spine*. Feb 1 1999;24(3):281-288; discussion 288-289.
184. Suwa H, Hanakita J, Ohshita N, Gotoh K, Matsuoka N, Morizane A. Postoperative changes in paraspinal muscle thickness after various lumbar back surgery procedures. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. Mar 2000;40(3):151-154; discussion 154-155.
185. Chosa E, Goto K, Totoribe K, Tajima N. Analysis of the effect of lumbar spine fusion on the superior adjacent intervertebral disk in the presence of disk degeneration, using the three-dimensional finite element method. *J Spinal Disord Tech*. Apr 2004;17(2):134-139.
186. Tan Y, Wang G, Fan H, Wang X, Lu J, Zhang X. Expression of core binding factor 1 and osteoblastic markers in C2C12 cells induced by calcium phosphate ceramics in vitro. *J Biomed Mater Res A*. Jul 2007;82(1):152-159.

- 187.** Qu SX, Guo X, Weng J, et al. Evaluation of the expression of collagen type I in porous calcium phosphate ceramics implanted in an extra-osseous site. *Biomaterials*. Feb 2004;25(4):659-667.

7 Abkürzungsverzeichnis

ALP	Alkaline Phosphatase
BCP	Biphasisches Kalziumphosphat
BMP	Bone Morphogenetic Protein
CT	Computertomographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EU	Europäische Union
FGF	Fibroblast Growth Factor
Ggr.	Geringgradig
HA	Hydroxyapatit
Hgr.	Hochgradig
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
I.m.	Intramuskulär
I.v.	Intravenös
L1-L6	1. Lendenwirbel,,6. Lendenwirbel
LWS	Lendenwirbelsäule
M.	Musculus
MBCP	Mikro-Makroporöses Biphasisches Kalziumphosphat
Mgr.	Mittelgradig
MSC	Mesenchymal Stem Cell
N.b.	Nicht beurteilbar
NGF	Nerve Growth Factor
OCD	Osteochondrosis Dissecans
OP	Operation
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
P.o	Peroral
PTH	Parathormon
RNA	Ribonukleinsäure
S.c.	Subkutan
SBF	Simulated Body Fluid
TCP	Trikalziumphosphat
TUNEL	Terminale Desoxyribosyl-Transferase Mediated dUTP Nick End Labeling
ZNS	Zentrales Nervensystem

8 Anhang

8.1 Abbildungen



Abb.1: von links nach rechts: Weitlaner Wundspreizer, Spülkanüle, Hohmannhebel (2), Raspatorium, Luer Zangen (klein, gross)



Abb.2: von links nach rechts: Pedikelahle, Pedikelvertiefungssahle, Längenmessgerät, Schrauben (4), Schraubenzieherschaft (2), Stäbe (2), Verschlusskappen (4), Spannmuttern (4), Stabstößel

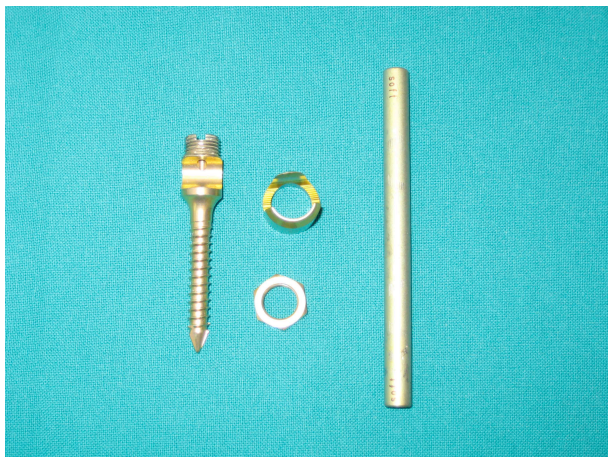


Abb.3: links: vormontierte Pedikelschraube mit dualern Kern, seitlicher Öffnung und selbstschneidendem Gewinde, Mitte oben: Verschlusskappe, Mitte unten: Spannmutter, rechts: Stab

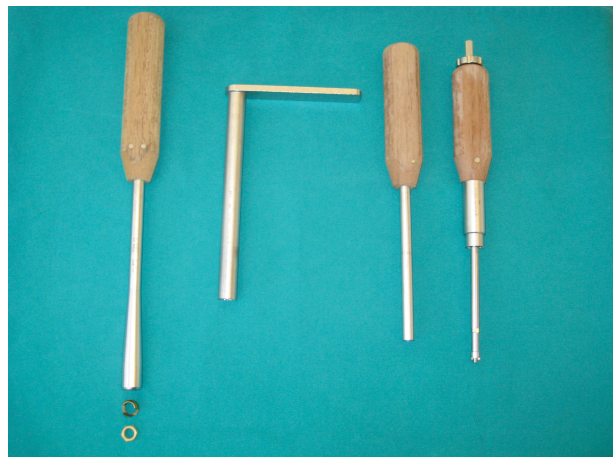


Abb.4: von links nach rechts: hexagonaler Schraubenzieher mit Verschlusskappe und Spannmutter, Hexagonale Haltehülse, Repositionshandgriff, selbsthaltender Schraubenzieherschaft mit Griff



Abb.5: von links nach rechts: Seitenschneider, Hammer, Langenbeck Wundhaken (2)

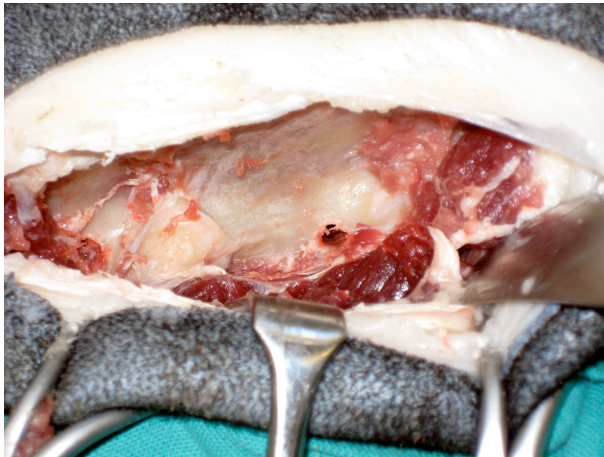


Abb.6: links: Facettengelenk, rechts: nach Eröffnung des Pedikelkortex mittels Pedikelahle

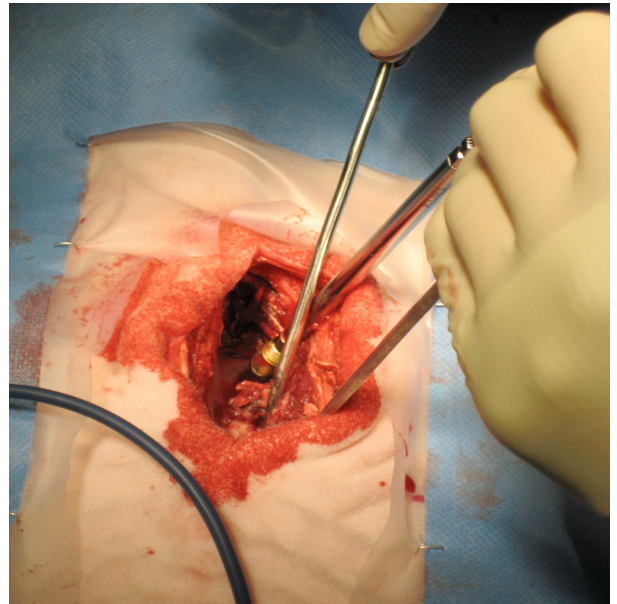


Abb.7: Vorne im Bild: Eröffnung des Pedikelkortex mittels Pedikelahle, dahinter: Schraube mit selbsthaltendem Schraubenzieherschaft

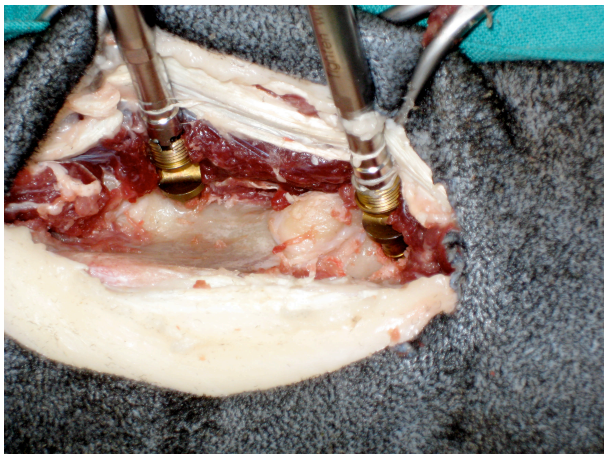


Abb.8: Pedikelschrauben mit je einem selbsthaltenden Schraubenzieherschaft

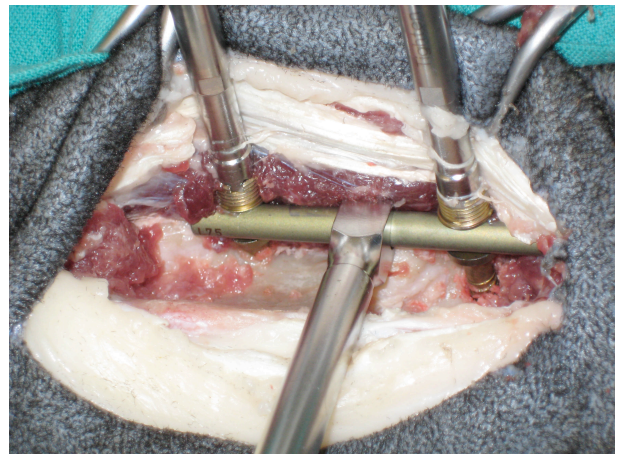


Abb.9: Fixierung des Stabes in den Köpfen der Pedikelschrauben mittels Stabstößel

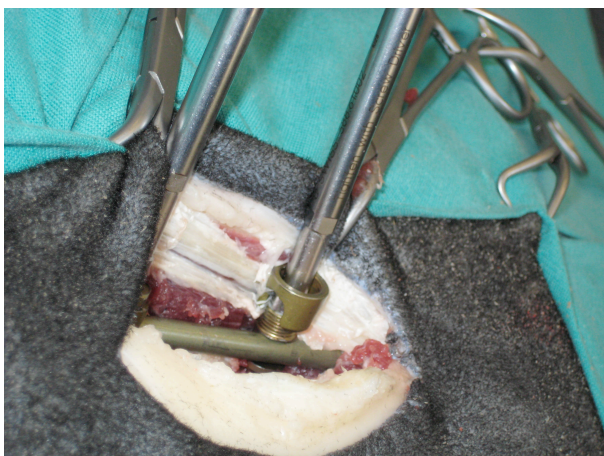
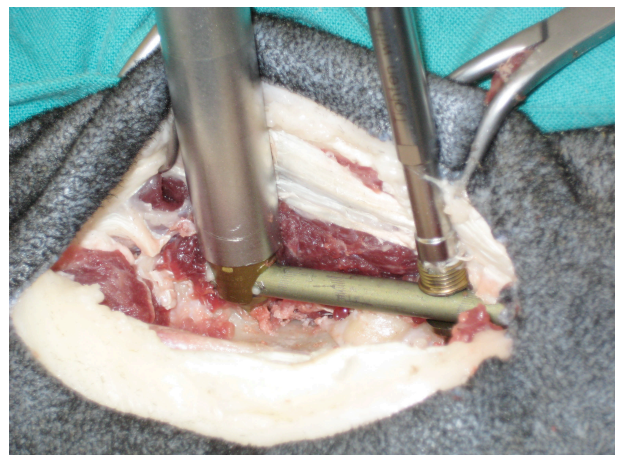


Abb.10 und 11: Die Verschlusskappen werden auf die Köpfe der Schrauben platziert (oben im Bild), die Spannmuttern werden mit hexagonalem Schraubenzieher fixiert und anschliessend mit hexagonaler Haltehülse und Repositionsgriff festgedreht (rechts im Bild)



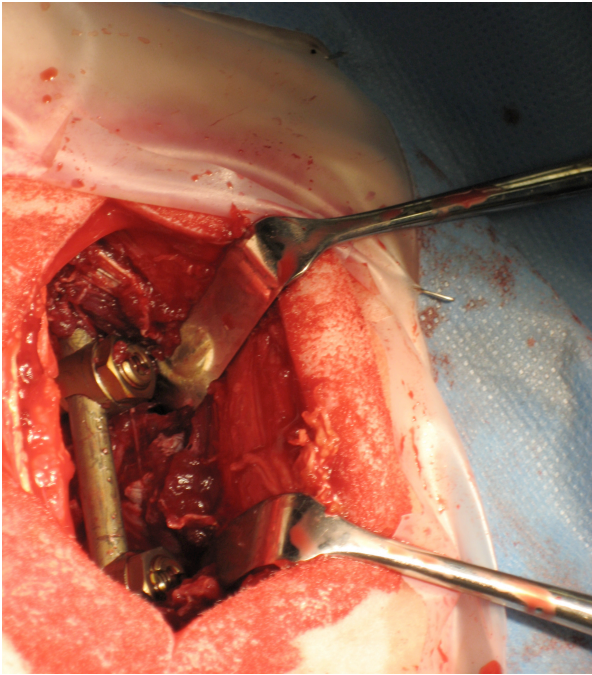


Abb.12: Pedikelschraubensystem, zur Implantation der gruppenspezifischen Materialien wird die Wundhöhle mittels Langenbeck Wundhaken maximal gespreizt

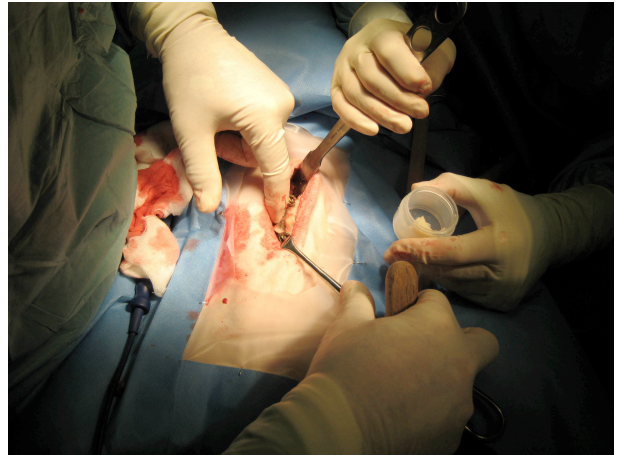


Abb.13: Implantation von Fibrin, PTH und MBCP (Gruppe D)

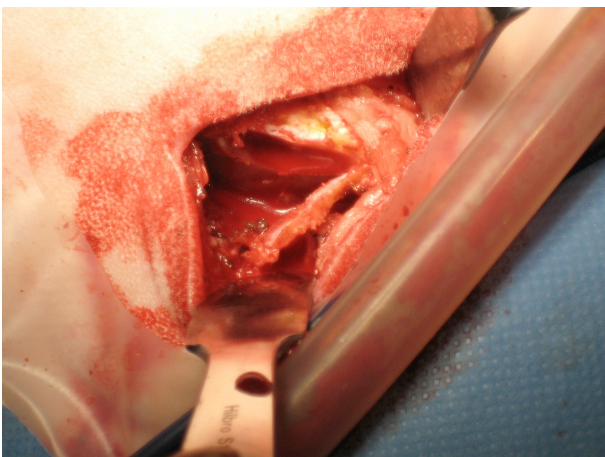


Abb.14: Entnahme eines kortikospongiösen Knochentransplantates auf der Caudalseite der Crista iliaca

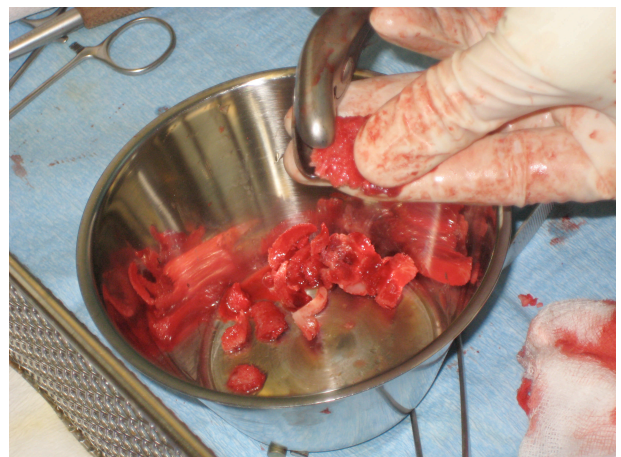


Abb.15: Das gewonnene Knochentransplantat wird in Streifen geschnitten und bis zur Transplantation in Eigenblut konserviert



Abb.16: Schraubenperforation des anterioren Wirbelkörperkortex



Abb.17: Implantatdebris



Abb.18: Intraoperativ vergessener Tupfer, auf dieser Seite war weder Knochenneubildung, noch eine Fusion zu verzeichnen

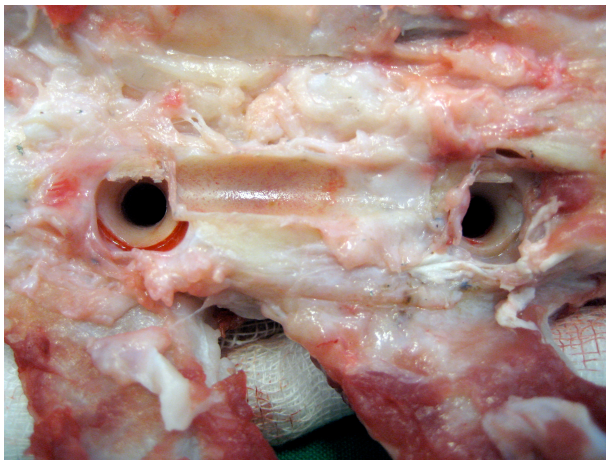


Abb.19: Neu gebildetes Knochenmaterial reicht bei vielen Proben bis an die Ventralseite der Stäbe und bildet eine deutliche Knochenrinne aus

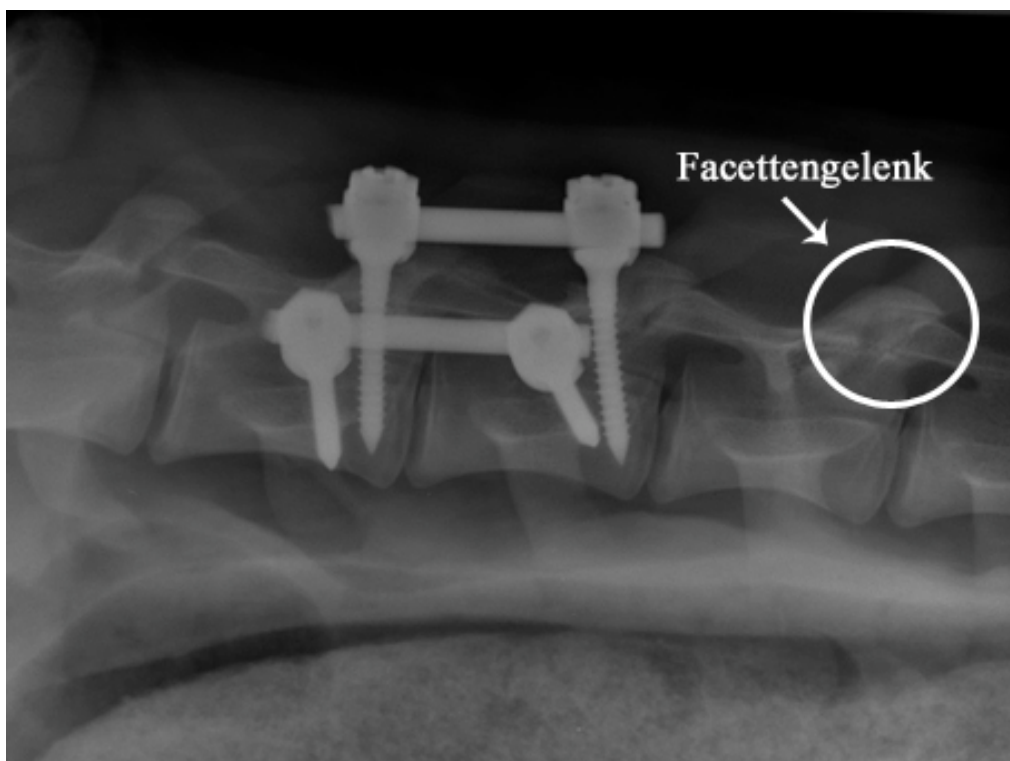


Abb.20: Beurteilung der Röntgenbilder: Im markierten Facettengelenk sind sowohl die Kontur der gelenkbildenden Strukturen, der Gelenkspalt selbst und eine physiologische Knochendichte sichtbar. Dasselbe gilt für das Facettengelenk zwischen den fusionierten Wirbeln L4/L5. (4008, 16 Wochen post OP)



Abb.21: Die Knochenkontur der gelenkbildenden Strukturen des Facettengelenks zwischen den fusionierten Wirbeln L4/L5, sowie der Gelenkspalt sind nicht mehr sichtbar, die Knochendichte ist physiologisch, interessanterweise sind im cranialen Gelenk dieselben Anzeichen einer Fusion feststellbar

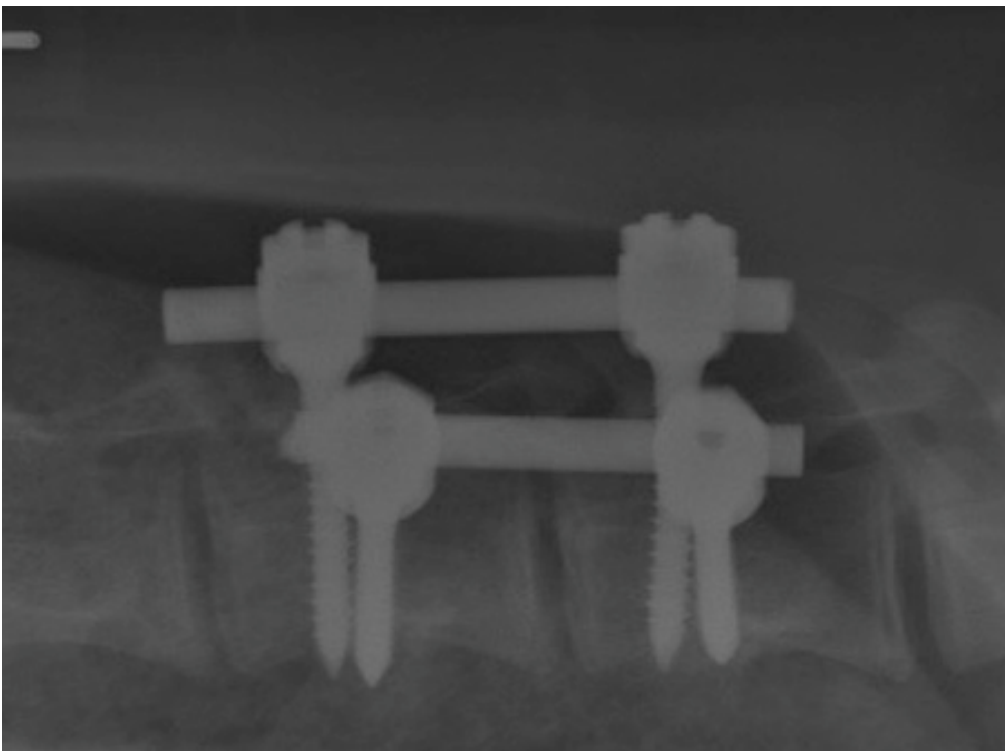


Abb.22: Das Facettengelenk der Wirbel L4/L5 ist komplett von der dorsalen Gasblase des Pansens überlagert und kann daher weder die Knochenkontur, noch die Knochendichte betreffend beurteilt werden, ein weiteres Problem in der Beurteilung dieses Röntgenbildes stellt die Überlagerung der Gelenkanteile durch das Pedikelschraubensystem dar

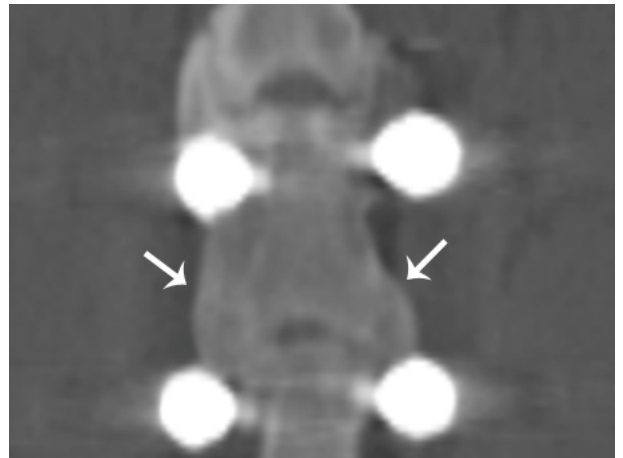


Abb.23 und 24: Beurteilung der CT-Bilder: Die Facettengelenke sind jeweils mit Pfeilen markiert. Im linken Bild sind sowohl der linke als auch der rechte Gelenkspalt fast zur Gänze sichtbar (4008, 12 Wochen post OP), während im rechten Bild beide Facettengelenke komplett fusioniert sind. (4006, 44 Wochen post OP)

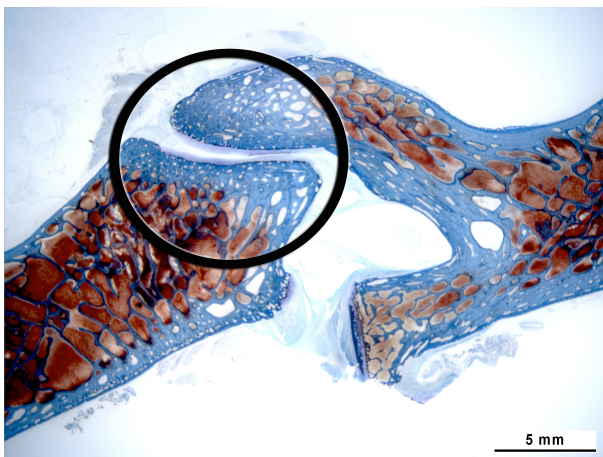


Abb.25: Facettegelenk eines physiologischen Lendenwirbels mit intaktem Gelenkknorpel (0000 rechts)

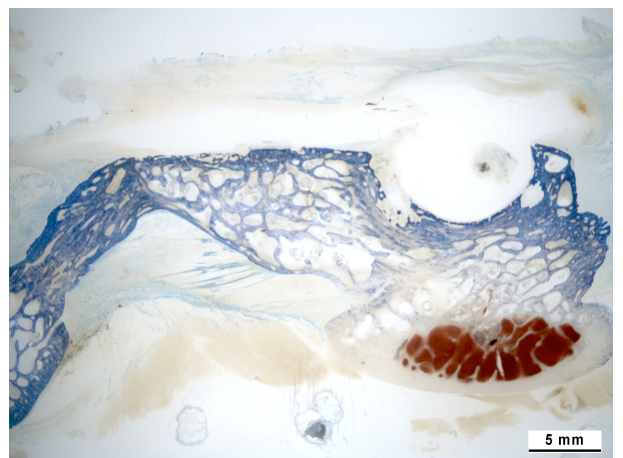
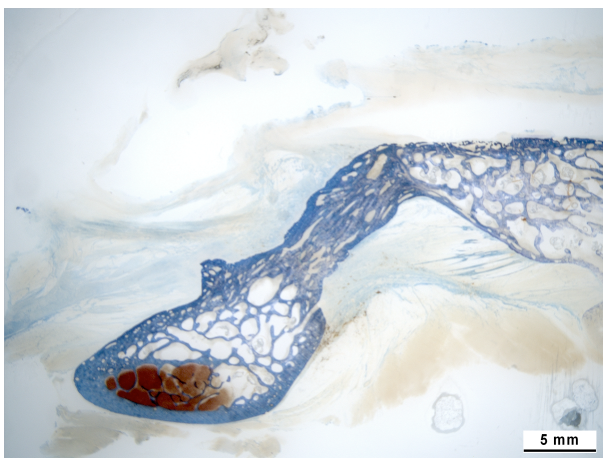


Abb.26 und 27: Ausbildung einer deutlichen Knochenbrücke an der Basis der Transversalfortsätze 1 Jahr nach der Operation (4003 rechts, Negativkontrolle)

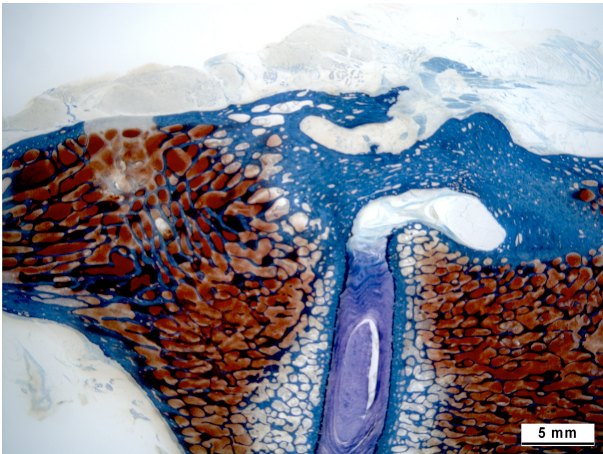


Abb.28: Ausbildung einer deutlichen Knochenbrücke im Bereich des aufgefrischten Facettengelenks 1 Jahr nach der Operation (4001 rechts, Negativkontrolle)

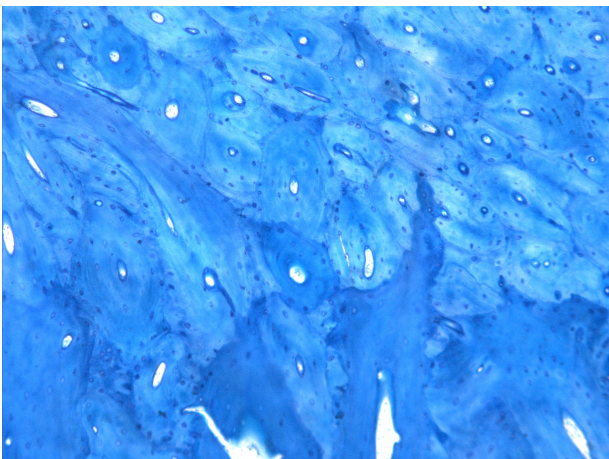


Abb.29: Ausdifferenzierter Lamellenknochen (oben im Bild) und juveniler Lamellenknochen mit Geflechtknocheninseln (unten im Bild) in einer neu gebildeten Knochenbrücke der Gruppe A (4001 links)

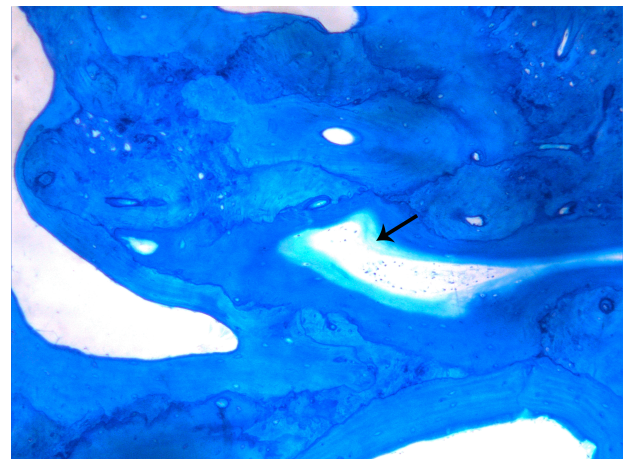


Abb.30: Juveniler Lamellenknochen und Geflechtknochen in einer Knochenzubildung der Gruppe B (4009 rechts), der Pfeil weist auf einen Hohlzylinder mit frischem Osteoid und Osteoblasten

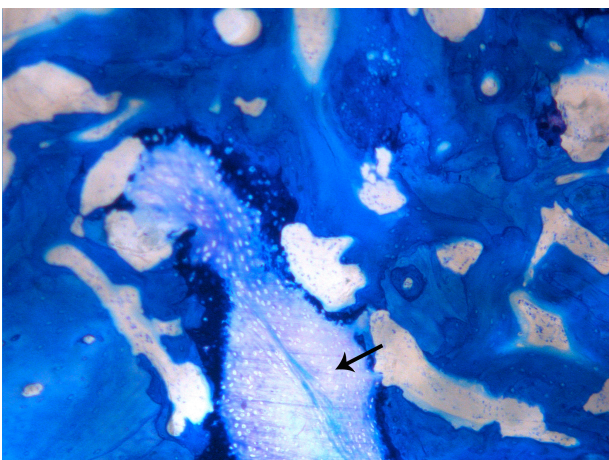


Abb.31: Enchondrale Ossifikation: Knorpelinsel in neu gebildetem Knochengewebe, die Chondrozyten sind im Begriff sich in Geflechtknochen zu differenzieren (4004 links)

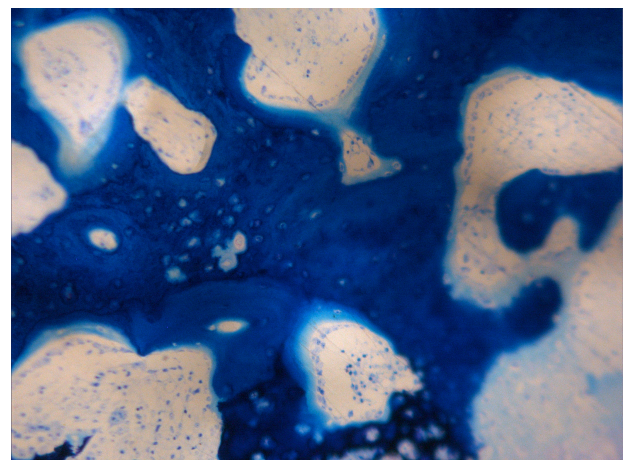


Abb.32: Gruppe C: Grosser Anteil an Geflechtknochen und nur wenig juveniler Lamellenknochen, in den Hohlzylindern befindet sich viel frisches Osteoid, Osteoblasten und vereinzelt Lymphozyten und Plasmazellen (4017 rechts)

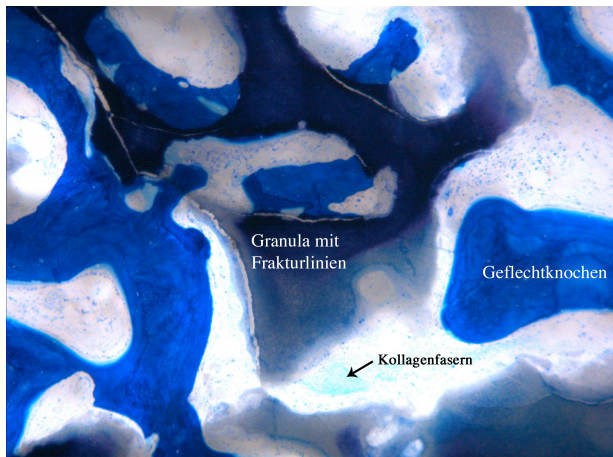


Abb.33: Granula und neu gebildeter Geflechtknochen, dazwischen befindet sich fibrovaskuläres Gewebe mit Entzündungszellen als Zeichen einer immunologischen Reaktion und Kollagenfasern, die Fibrose spricht eindeutig für eine desmale Ossifikation (4014 rechts)

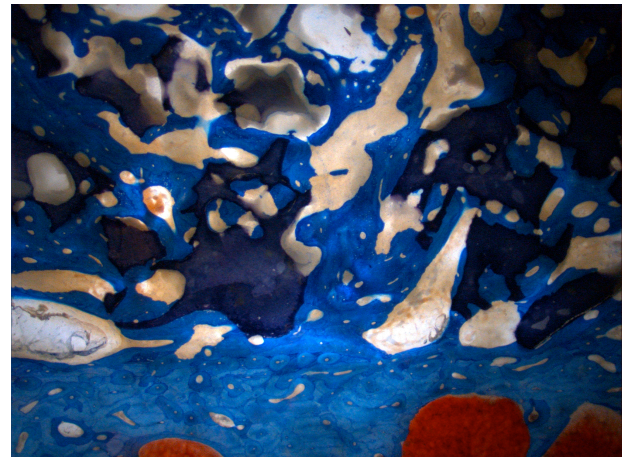


Abb.34: Neues Knochengewebe wächst vom Mutterknochen ausgehend in die Granula ein (4014 rechts)

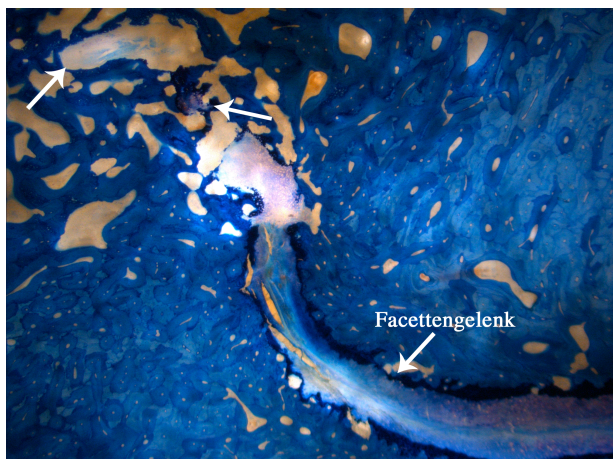


Abb.35: Facettengelenk und neu gebildetes Knochengewebe, die beiden Pfeile weisen auf versprengte Knorpelinseln, die im Begriff sind sich in Geflechtknochen zu differenzieren (4020 rechts)

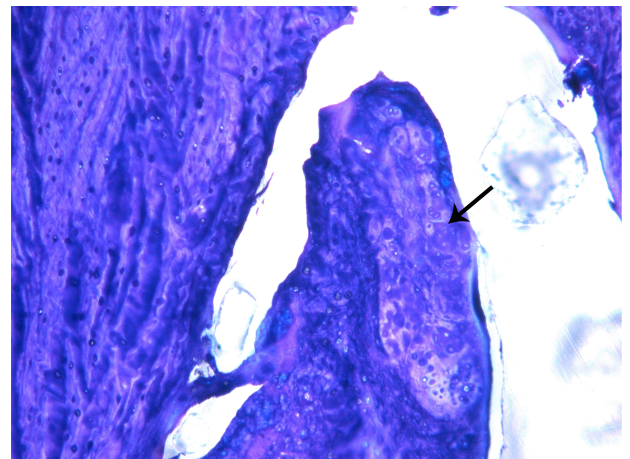


Abb.36: Chondrone als Zeichen einer Knorpelregeneration in der Bandscheibe vom fusionierten Segment 4017 rechts

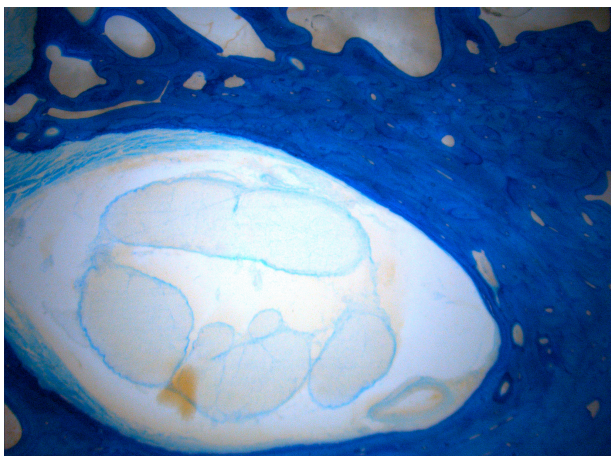


Abb.37: Dorsal der Bandscheibe vom fusionierten Segment 4006 rechts wurde ein Nerv angeschnitten, der in neues Knochengewebe eingemauert ist

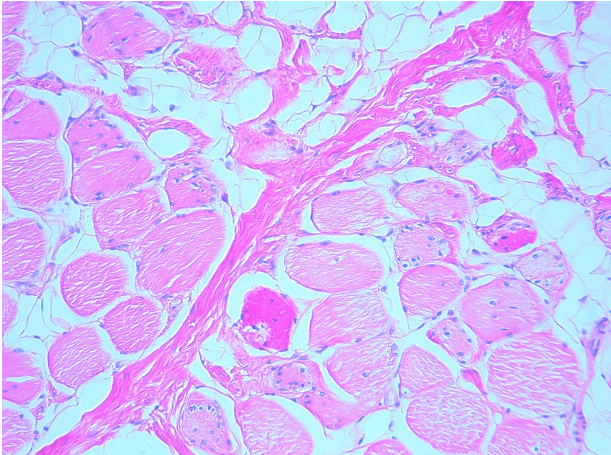


Abb.38: Multifokale Muskeldegeneration mit Zentralisation der Zellkerne, zum Teil Ersatz durch Fettgewebe (Probe 4007)

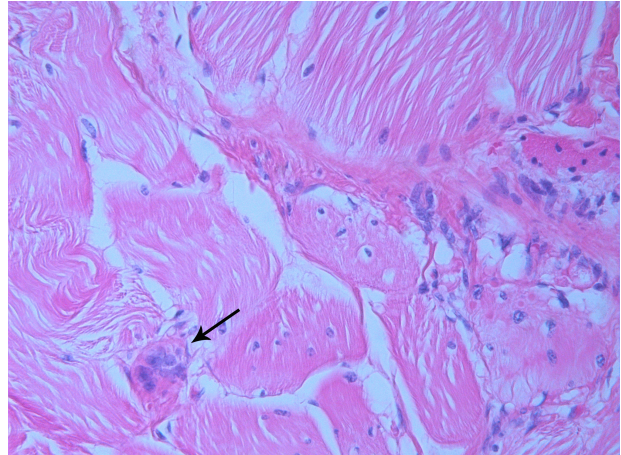


Abb.39: Muskelregeneration, Pfeil zeigt auf eine vielkernige juvenile Muskelzelle (Probe 4004)

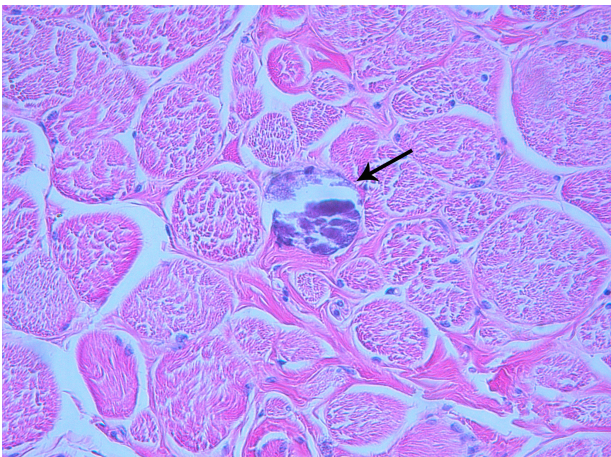


Abb.40: Fokale Verkalkung des Muskelgewebes (Probe 4009)

8.2 Tabellen

Tab. 1a-k: Ergebnisse des Röntgenscoring der Vorstudie

Tab. a

Schafnummer	Zeit post OP (Wochen)	Subluxation (cm)	Knochenkontur		Knochendichte	
			links	rechts	links	rechts
4001	4	0,5	1	0	1	1
	8	0,3	1	1	2	2
	12	0,2	1	1	2	2
	16	0,3	0	0	1	1
	20	0,2	1	1	2	2
	24	0,2	1	0	2	2
	28	0,15	1	n.b.	2	2
	32	0,2	1	1	1	2
	36	0,1	n.b.	n.b.	2	2
	40	0,15	n.b.	1	1	1
	44	0,1	n.b.	n.b.	1	1
	48	0,15	0	0	1	2

Tab. b

Schafnummer	Zeit post OP (Wochen)	Subluxation (cm)	Knochenkontur		Knochendichte	
			links	rechts	links	rechts
4002	4	0,1	1	n.b.	1	n.b.
	8	0,1	0	1	1	1
	12	0,15	0	0,5	1	1
	16	0,15	0	0,5	1	1
	20	0	0	n.b.	2	1
	24	0,1	0	0	2	1
	28	0	n.b.	0.	2	2
	32	0	0	0	2	2
	36	0,2	0	0	1	2
	40	0,2	0	0	1	1
	44	0	0	0	1	1
	48	0	0	0	1	1

Tab. c

Schafnummer	Zeit post OP (Wochen)	Subluxation (cm)	Knochenkontur		Knochendichte	
			links	rechts	links	rechts
4003	4	0	n.b.	1	n.b.	1
	8	0	1	0,5	2	1
	12	0	0,5	0,5	2	2
	16	0	0,5	n.b.	1	n.b.
	20	0	0,5	0	1	2
	24	0	n.b.	n.b.	1	2
	28	0	n.b.	n.b.	2	2
	32	0	n.b.	0,5	2	2
	36	0	n.b.	0	n.b.	2
	40	0	0,5	0,5	1	1
	44	0	0,5	1	1	1
	48	0	0	0	1	1

Tab. d

Schafnummer	Zeit post OP (Wochen)	Subluxation (cm)	Knochenkontur		Knochendichte	
			links	rechts	links	rechts
4004	4	0	1	1	2	2
	8	0	0	0	1	1
	12	0	0	0,5	1	1
	16	0	0	0	1	1
	20	0	0	0	1	2
	24	0	0	0	1	1
	28	0	0	0	2	2
	32	0	0,5	0,5	3	3
	36	0	n.b.	0,5	n.b.	3
	40	0	0	0	1	3
	44	0,1	0,5	0,5	1	1
	48	0	0,5	0,5	2	2

Tab. e

Schafnummer	Zeit post OP (Wochen)	Subluxation (cm)	Knochenkontur		Knochendichte	
			links	rechts	links	rechts
4005	4	0,05	1	1	2	2
	8	0	1	1	2	2
	12	0,1	0,5	1	1	1
	16	0,05	0	0	1	1
	20	0,1	n.b.	n.b.	2	2
	24	0	1	n.b.	1	n.b.
	28	0,1	0,5	n.b.	2	n.b.
	32	0,1	0,5	n.b.	2	2
	36	0,1	0	0	2	1
	40	0,1	0	0	1	2
	44	0	0	0	2	1
	48	0,1	0	n.b.	1	n.b.

Tab. f

Schafnummer	Zeit post OP (Wochen)	Subluxation (cm)	Knochenkontur		Knochendichte	
			links	rechts	links	rechts
4006	4	0	1	n.b.	1	n.b.
	8	0	n.b.	1	n.b.	n.b.
	12	0	0,5	0,5	1	1
	16	0	0	n.b.	n.b.	n.b.
	20	0	n.b.	0	n.b.	2
	24	0	n.b.	0,5	1	2
	28	0	n.b.	n.b.	2	2
	32	0	n.b.	n.b.	2	2
	36	0	0,5	n.b.	1	1
	40	0	0	n.b.	1	1
	44	0	0	n.b.	1	1
	48	0	n.b.	0,5	2	2

Tab. g

Schafnummer	Zeit post OP (Wochen)	Subluxation (cm)	Knochenkontur		Knochendichte	
			links	rechts	links	rechts
4007	4	0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
	8	0	n.b.	0	n.b.	n.b.
	12	0	0	0,5	n.b.	2
	16	0	0	0	2	1
	20	0	0	0,5	2	1
	24	0,1	0	0	3	2
	28	0,1	0	0	3	2
	32	0,1	0	0	3	2
	36	0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
	40	0	0	0	2	2
	44	0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
	48	0	0	0	2	2

Tab. h

Schafnummer	Zeit post OP (Wochen)	Subluxation (cm)	Knochenkontur		Knochendichte	
			links	rechts	links	rechts
4008	4	0,1	1	1	2	2
	8	0,1	1	1	2	2
	12	0,1	1	1	2	2
	16	0,1	1	1	2	2
	20	0,1	1	1	2	2
	24	0,1	1	1	2	2
	28	0,1	1	1	2	2
	32	0,1	0,5	0,5	2	2
	36	0,1	0	n.b.	2	n.b.
	40	0,1	0,5	0	2	2
	44	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-

Tab. i

Schafnummer	Zeit post OP (Wochen)	Subluxation (cm)	Knochenkontur		Knochendichte	
			links	rechts	links	rechts
4009	4	0	n.b.	n.b.	1	1
	8	0	n.b.	n.b.	2	2
	12	0	0	0	1	1
	16	0	0	0	1	1
	20	0	n.b.	n.b.	n.b.	1
	24	0	n.b.	n.b.	1	1
	28	0	0	0	1	1
	32	0	n.b.	n.b.	2	2
	36	0	0	0	2	2
	40	0	0	0	2	2
	44	0	0	0,5	1	3
	48	0	0	0,5	1	3

Tab. j

Schafnummer	Zeit post OP (Wochen)	Subluxation (cm)	Knochenkontur		Knochendichte	
			links	rechts	links	rechts
4010	4	0	0,5	0,5	1	1
	8	0	0	0,5	1	2
	12	0	0	0	1	2
	16	0	1	0	1	1
	20	0	n.b.	0,5	n.b.	1
	24	0	0	n.b.	1	n.b.
	28	0	0	0	1	1
	32	0	0,5	0	1	2
	36	0	0	n.b.	1	1
	40	0	0	0,5	1	1
	44	0	0	n.b.	1	1
	48	0	0	0	1	1

Tab. k

Schafnummer	Zeit post OP (Wochen)	Subluxation (cm)	Knochenkontur		Knochendichte	
			links	rechts	links	rechts
4012	4	0	0,5	0	1	1
	8	0	0	n.b.	1	1
	12	0	0,5	0	2	2
	16	0	0	0	1	2
	20	0	0	0	1	1
	24	0	0	n.b.	1	n.b.
	28	0	0	n.b.	1	1
	32	0	0	0	1	2
	36	0	0	n.b.	2	1
	40	0	0	n.b.	2	1
	44	0	0	n.b.	2	2
	48	0	0	0	2	2

Tab. 2: Beurteilung der CT-Bilder von Gruppe A der Vorstudie

Gruppe	Zeit post OP (Wochen)	Fusionsstatus							
		Schaf – Nr.							
		4002		4004		4005		4006	
		links	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts
A Negativ- kontrolle	12	-	-	-	-	-	-	2	2
	16	3	1	3	3	1	1	2	3
	20	4	2	3	2	1	2	3	4
	24	5	2	3	3	1	2	4	5
	28	5	4	3	3	2	3	4	5
	32	5	5	3	3	2	3	5	5
	36	5	4	5	4	2	3	4	5
	40	5	4	3	3	2	4	5	5
	44	5	4	4	4	3	4	5	5
	48	5	4	5	4	3	4	-	-

Tab. 3: Beurteilung der CT-Bilder von Gruppe B der Vorstudie

Gruppe	Zeit post OP (Wochen)	Fusionsstatus			
		Schaf – Nr.			
		4008		4010	
		links	rechts	links	rechts
B Autologer Knochen	12	2	2	3	3
	16	1	2	3	3
	20	1	1	3	4
	24	1	2	5	5
	28	2	4	4	5
	32	3	5	5	5
	36	3	5	5	5
	40	-	-	5	5
	44	-	-	5	5
	48	-	-	-	-

b. 4a-4b: Beurteilung der CT Bilder der Hauptstudie

Tab.a: Gruppe C

Gruppe	Schaf-Nr.	Fusionsstatus	
		12 Wochen post OP	
		links	rechts
C Fibrin PTH	4013	1	1
	4017	2	3
	4019	1	1
	4020	1	1
	4021	1	1
	4027	2	1

Tab. b: Gruppe D

Gruppe	Schaf-Nr.	Fusionsstatus	
		12 Wochen post OP	
		links	rechts
D Fibrin PTH MBCP	4014	2	1
	4015	3	2
	4016	1	2
	4018	3	2
	4025	3	2
	4026	4	4

Tab. 5: Ergebnisse der makroskopischen Beurteilung

Gruppe		Tiernummer	Knochenmassenzunahme		Fusionsstatus	
			links	rechts	links	rechts
A	Negativ-kontrolle	4001	2	2	2	2
		4002	2	2	2	2
		4003	2	2	2	2
		4004	2	2	2	2
		4005	2	2	2	2
		4006	3	3	2	2
B	Autologer Knochen	4007	1	1	2	2
		4008	2	2	2	2
		4009	2	2	2	2
		4010	3	1	0	2
		4012	1	1	2	2
C	Fibrin PTH	4013	1	1	2	2
		4017	2	2	2	2
		4019	1	2	2	2
		4020	1	1	2	2
		4021	1	1	2	2
		4027	2	2	2	2
D	Fibrin MBCP PTH	4014	0	0	2	2
		4015	1	1	2	2
		4016	1	0	2	2
		4018	1	0	2	2
		4025	2	1	2	2
		4026	2	1	2	2

Tab. 6: Ergebnisse der Beurteilung der Faxitronbilder der Vorstudie

Gruppe	Zeit post OP (Wochen)	Schaf-Nr.	Knochenkontur		Knochendichte	
			links	rechts	links	rechts
A Negativkontrolle	52	4001	0	n.b.	2	n.b.
		4002	0	0	2	2
		4003	0	0	2	2
		4004	0	0	2	2
		4005	0	0	2	2
		4006	0	0	2	2
B Autologer Knochen		4007	0	0	2	2
		4008	0	0	2	2
		4009	0	0	2	2
		4010	0	0	2	2
		4012	0	0	2	2

Tab. 7: Ergebnisse der Beurteilung der Faxitronbilder der Hauptstudie

Gruppe	Zeit post OP (Wochen)	Schaf-Nr.	Knochenkontur		Knochendichte	
			links	rechts	links	rechts
C Fibrin PTH	16	4013	0.5	0.5	2	2
		4017	0,5	0	2	2
		4019	0.5	0	2	2
		4020	1	0.5	2	2
		4021	0	0.5	2	2
		4027	1	0.5	2	2
D Fibrin PTH MBCP		4014	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
		4015	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
		4016	0.5	0.5	2	2
		4018	0.5	0.5	2	2
		4025	0	0	2	2
		4026	n.b.	n.b.	2	2

Tab. 8: Subjektive Einschätzung der Geflecht - und Lamellenknochenanteile des neu gebildeten Knochens in den histologischen Dickschnitten von Gruppe A

Schaf Nr.	Seite	Anatomische Lokalisation	Schnitt	Strukturen	GK (%)	LK (%)
4001	links	Wirbelkörperanteil, Knochenbrücke	1	Knochenbrücke	20	80
		Schräg angeschnitten, Transversalfortsatzbasis, Wirbelkörper mit Schraubenloch, Bandscheibe, Facettengelenk, schmale Knochenbrücke	2	Knochenbrücke	95	5
4001	rechts	Schräg angeschnitten, Transversalfortsatz, Wirbelkörperanteil mit Bandscheibe	1	Knochenzubildung	100	
		Wirbelkörper mit Bandscheibe, deutliche Knochenbrücke	2	Knochenbrücke	10	90
4002	links	Transversalfortsatzbasis, schräg angeschnitten	1	Transversalfortsatz (Geflechtknochensaum) Knochenzubildung	100 50	50
		Schräg angeschnitten, Transversalfortsatzbasis, Facettengelenk angeschnitten, Knochenzubildung	2	Transversalfortsatz (Geflechtknochensaum) Knochenzubildung	100 40	60
4002	rechts	Transversalfortsatzbasis	1	Transversalfortsätze	50	50
		Transversalfortsatzbasis, Wirbelkörperanteil angeschnitten, kleine Knocheninsel	2	Transversalfortsätze	60	40
4003	links	Transversalfortsatzbasis	1	Transversalfortsätze (Geflechtknochensaum)	100	
		Transversalfortsatzbasis, Wirbelkörperanteil angeschnitten	2	Transversalfortsätze (Geflechtknochensaum)	100	
4003	rechts	Transversalfortsatzbasis	1	Transversalfortsätze (Geflechtknochensaum)	100	
		Transversalfortsatzbasis, deutliche Knochenbrücke	2	Knochenbrücke	20	80
4004	links	Wirbelkörper angeschnitten, Bandscheibe, Facettengelenk angeschnitten	1	Knochenzubildungen	10	90
		Wirbelkörper angeschnitten, beide Schraubenlöcher, Bandscheibe, Facettengelenk angeschnitten	2	Knochenzubildungen	5	95
4004	rechts	Transversalfortsatzbasis	1	Transversalfortsätze (Geflechtknochensaum)	100	
		Schräg angeschnitten, Transversalfortsatzbasis, Wirbelkörper angeschnitten, Facettengelenk angeschnitten	2	Knochenzubildungen	30	70
4005	links	Transversalfortsatzbasis	1	Transversalfortsätze	80	20
		Facettengelenk angeschnitten	2	Knochenzubildungen	60	40
4005	rechts	Transversalfortsatzbasis	1	Knochenzubildungen	20	80
		Transversalfortsatzbasis, Facettengelenk	2	Transversalfortsatz Knochenzubildung	60 20	40 80
4006	links	Transversalfortsatzbasis	1	Transversalfortsatz (Geflechtknochensaum) Knocheninsel	100 20	80
		Facettengelenk	2	Knochenzubildung	50	50
4006	rechts	Schräg angeschnitten, Transversalfortsatzbasis, Wirbelkörper angeschnitten, Facettengelenk angeschnitten	1	Transversalfortsatz (Geflechtknochensaum) Knochenzubildung	100 5	95
	links	schräg angeschnitten, Wirbelkörper	2	Knochenbrücke	30	70

Tab. 9: Subjektive Einschätzung der Geflecht – und Lamellenknochenanteile des neu gebildeten Knochens in den histologischen Dickschnitten der Gruppe B

Schaf Nr.	Seite	Anatomische Lokalisation	Schnitt	Strukturen	GK (%)	LK (%)
4007	links	Transversalfortsatzbasis	1	Transversalfortsatz Knochenzubildung Knocheninsel	50 95 50	50 5 50
		Transversalfortsatzbasis, deutliche Knochenbrücke	2	Knochenbrücke	40	60
4007	rechts	Transversalfortsatzbasis	1	Transversalfortsatz rechts Transversalfortsatz links (Geflechtknochensaum) Knocheninsel	40 100 70	60 30
		Transversalfortsatzbasis	2	Transversalfortsatz rechts Transversalfortsatz links Knocheninsel	50 70 70	50 30 30
4008	links	Transversalfortsatzbasis	1	Transversalfortsatz (Geflechtknochensaum)	100	
		Facettengelenk	2	Knochenzubildung links Knochenzubildung rechts	40 20	60 80
4008	rechts	Transversalfortsatzbasis	1	Transversalfortsätze Knocheninsel	40 40	60 60
		Transversalfortsatzbasis	2	Transversalfortsätze Knocheninsel	40 40	60 60
4009	links	Schräg angeschnitten, Transversalfortsatzbasis, Facettengelenk angeschnitten, deutliche Knochenbrücke	1	Knochenbrücke	80	20
		Schräg angeschnitten, Transversalfortsatzbasis, Wirbelkörper angeschnitten, Teil Bandscheibe, Knochenbrücke mit kleiner Unterbrechung	2	Knochenbrücke	70	30
4009	rechts	Schräg angeschnitten, Transversalfortsatzbasis, deutliche Knochenbrücke	1	Knochenbrücke	60	40
		Schräg angeschnitten, Transversalfortsatzbasis, Facettengelenk angeschnitten, deutliche Knochenbrücke	2	Knochenbrücke	60	40
4010	links	Transversalfortsatzbasis	1	Knochenzubildung rechts Transversalfortsatz links (Geflechtknochensaum)	50 100	50
		Wirbelkörper mit Bandscheibe, Facettengelenk	2	Knochenzubildungen	70	30
4010	rechts	Transversalfortsatzbasis, Knochenbrücke mit Unterbrechung	1	Knochenbrücke	70	30
		Transversalfortsatzbasis, deutliche Knochenbrücke	2	Knochenbrücke	60	40
4012	links	Transversalfortsatzbasis	1	Knochenzubildung	80	20
		Facettengelenk angeschnitten, deutliche Knochenbrücke	2	Knochenbrücke	60	40
4012	rechts	Transversalfortsatzbasis, Knochenbrücke mit Unterbrechung	1	Knochenbrücke	70	30
		Facettengelenk	2	Knochenbrücke	70	30

Tab. 10: Subjektive Einschätzung der Geflecht – und Lamellenknochenanteile des neu gebildeten Knochens der histologischen Schnitte der Gruppe C

Schaf Nr.	Seite	Anatomische Lokalisation	Schnitt	Strukturen	GK (%)	LK (%)
4013	links	Transversalfortsatzbasis	1	Transversalfortsätze	95	5
		Wirbelkörper mit Bandscheibe, Schraubenlöcher, Wirbelkanal, Facettengelenk, Knochenbrücke	2	Knochenzubildung	90	10
4013	rechts	Transversalfortsatzbasis	1	Transversalfortsätze	95	5
		Wirbelkörper mit Bandscheibe, Schraubenloch	2	Knochenzubildung	100	
4017	links	Transversalfortsatzbasis	1	Transversalfortsätze	100	
		Wirbelkörper mit Bandscheibe, Schraubenlöcher, Facettengelenk, deutliche Knochenbrücke	2	Knochenzubildung	70	30
4017	rechts	Schräg angeschnitten, Wirbelkörper mit Teil der Bandscheibe, Facettengelenk angeschnitten	1	Knochenzubildung	95	5
		Wirbelkörper mit Bandscheibe, Schraubenlöcher, Wirbelkanal	2	Knochenzubildung	90	10
4019	links	Transversalfortsatzbasis	1	Transversalfortsätze (Geflecht-knochensaum)	100	
		Transversalfortsatzbasis Wirbelkörper angeschnitten	2	Transversalfortsätze (Geflecht-knochensaum) Knochenzubildung	100 100	
4019	rechts	Schräg angeschnitten, Transversalfortsatzbasis	1	Transversalfortsätze	80	20
		Wirbelkörper angeschnitten, Facettengelenk	2	Transversalfortsatz Knochenzubildung	90 90	10 10
4020	links	Transversalfortsatzbasis	1	Transversalfortsatz links Transversalfortsatz rechts	95 90	5 10
		Wirbelkörper mit Schraubenloch, Bandscheibe, Facettengelenk angeschnitten	2	Knochenzubildungen	60	40
4020	rechts	Transversalfortsatzbasis,	1	Knochenzubildung	50	50
		Wirbelkörper mit Teil der Bandscheibe, Facettengelenk	2	Knochenzubildung	60	40
4021	links	Transversalfortsatzbasis	1	Transversalfortsätze	95	5
		Transversalfortsatzbasis	2	Transversalfortsatz links Transversalfortsatz rechts	90 70	10 30
4021	rechts	Transversalfortsatzbasis	1	Transversalfortsatz rechts Knochenzubildung	70 50	30 50
		Transversalfortsatzbasis	2	Knochenzubildung Transversalfortsatz links	60 50	40 50

Tab. 11: Subjektive Einschätzung des neu gebildeten Knochens am Gesamtfeld der Granula (100%), Angabe der Lokalisation des neuen Knochens in der Granula und Einschätzung der Geflecht- und Lamellenknochenanteile des neuen Knochens der histologischen Dickschnitte von Gruppe D

Schaf Nr.	Seite	Anatomische Lokalisation	Schnitt	Anteil Knochen/Granula (%)	Ursprung/Lokalisation Knochen	GK (%)	LK (%)
4014	links	Transversalfortsatzbasis	1	40	vom MK aus	70	30
		Transversalfortsatzbasis	2	20	15% vom MK 5% im Zentrum	70 90	30 10
4014	rechts	Schräg angeschnitten, Transversalfortsatzbasis	1	30	25% vom MK 5% im Zentrum	80 100	20
		Schräg angeschnitten, Transversalfortsatzbasis, Wirbelkörper mit Teil Bandscheibe	2	30	20% vom MK 10% im Zentrum	80 100	20
4015	links	TF Basis	1	5	vom MK aus	100	
		Wirbelkörper mit Bandscheibe und Schraubenloch	2	20	im Zentrum	100	
4015	rechts	Schräg angeschnitten, Transversalfortsatzbasis, Wirbelkörper mit Bandscheibe und Schraubenloch	1	2	vom MK aus	100	
		Schräg angeschnitten, Wirbelkörper mit Schraubenloch und Bandscheibe, Teil des Wirbelkanals	2	2	im Zentrum	100	
4016	links	Transversalfortsatzbasis	1	5	4% vom MK 1% im Zentrum	95 100	5
		Facettengelenk	2	10	vom MK aus	90	10
4016	rechts	Transversalfortsatzbasis	1	5	im Zentrum	100	
		Schräg angeschnitten, Facettengelenk angeschnitten, Transversalfortsatzbasis	2	30	29% vom MK 1% im Zentrum	95 100	5
4018	links	Schräg angeschnitten, Transversalfortsatzbasis	1	15	im Zentrum	100	
		Schräg angeschnitten, Wirbelkörper mit Schraubenloch, Wirbelkanal, Teil der Bandscheibe	2	10	vom MK aus	95	5
4018	rechts	Transversalfortsatzbasis	1	5	im Zentrum	100	
		Transversalfortsatzbasis	2	10	6% vom MK 2% im Zentrum	100 100	

Tab.12: Histologische Beurteilung der mit van Kossa gefärbten Dünnschnitte der Gruppe D der Hauptstudie

Schaf Nr.	Seite	Anteil Knochen (%)	Anteil Bindegewebe (%)	Kalzifikation
4014	links	2	98	0
4014	rechts	2	98	0,5
4015	links	1	99	0
4015	rechts	2	98	0,5
4016	links	0	100	1
4016	rechts	0	100	0
4018	links	2	98	1
4018	rechts	1	99	1

Tab.13: Histologische Beurteilung der mit Toluidinblau gefärbten Dünnschnitte der Gruppe D der Hauptstudie

Schaf Nr.	Seite	Riesenzellen	Lymphozyten	Makrophagen	Plasmazellen
4014	links	2	1	3	1
4014	rechts	2	1	1	1
4015	links	2	1	3	0
4015	rechts	2	1	2	0
4016	links	1	2	2	1
4016	rechts	0	1	1	0
4018	links	1	1	2	0
4018	rechts	1	2	2	1

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meiner Chefin **Prof. Dr. Brigitte von Rechenberg** für die Aufnahme in ihre Abteilung, für die Überlassung des Themas und für ihre fachliche Unterstützung bei der Aufarbeitung meiner Dissertation danken.

Ein herzlicher Dank gebührt **Prof. Dr. Jörg A. Auer**, Direktor der Pferdeklinik der Vetsuisse – Fakultät, für die freundliche Unterstützung der MSRU, sowie den **Mitarbeitern der Pferdechirurgie** für die Überlassung des neuen Pferdeoperationssaals und für die Erlaubnis den chirurgischen Journal Club und das Morgenseminar besuchen zu dürfen.

Herrn **Prof. Dr. Max Aebi** danke ich herzlich für die Durchführung der Operationen und die Übernahme des Korreferates.

Vielen Dank auch dem **Anästhesisten Team** für die zwischenfallslose Durchführung der Schafnarkosen.

Einen grossen Dank möchte ich auch Herrn **Prof. Dr. Mark Flückiger** und **Dr. Mariano Makara** für die Durchsicht und Beurteilung der Röntgen – und CT-Bilder aussprechen.

Zudem bedanke ich mich beim gesamten **Radiologen Team** für die prompte Vergabe von Röntgen und CT-Terminen, die geduldige Durchführung derselben und die schnelle Bereitstellung des Bildmaterials.

Ein weiterer Dank gebührt **Kati Zlinsky, Sabina Wunderlin** und **Käthi Kämpf** für die Einweisung ins Laborgeschehen und die Herstellung der histologischen Präparate.

Ganz besonders bedanke ich mich bei **Monika Hilbe** für die Hilfe bei der Beurteilung der histologischen Schnitte.

Ein herzliches Dankeschön an meine **Kollegen aus der MSRU**, wobei ich **Birthe Pegel, Hannah Junge, Silvana Manzanell** und **Anja und Martin Waselau** für ihre menschliche und fachliche Unterstützung, sowie für ihre Kollegialität besonders hervorheben möchte.

Ein Dankeschön auch an die **Rinderklinik** für die fachliche Unterstützung bei der Behandlung schafrelevanter Erkrankungen, sowie für die Aufnahme und Therapie erkrankter Schafe aus unserem Bestand.

Ein grosser Dank gebührt auch den **Laboranten, Pflegern und Fahrern** des Tierspitals, sowie **Gottfried und Rösli Knüsel** für die gute Versorgung der Schafe und die Unterstützung der Durchführbarkeit unserer Untersuchungen.

Ein spezielles Dankeschön möchte ich **Bruno Gerzner** für die Hilfe bei der Schlachtung und beim Entfernen des Pedikelschraubensystems entgegenbringen.

Vielen, vielen Dank auch dem gesamten Team der **Pferdeklinik in Wien** für die fundierte Ausbildung und die schöne und lustige Zeit in den vergangenen Jahren. Bereits Gelerntes und die Erinnerungen an die schöne Zeit haben mir viele Tage leichter gemacht.

An dieser Stelle möchte ich auch meinem Freund und bislang besten Lehrer, **Karsten Velde** (DACVS), für die Weitergabe seines medizinischen Wissens und für seine seelische Unterstützung und Liebe danken.

Der grösste Dank gebührt aber meinem Vater **Josef Linsbichler** und meiner verstorbenen Mutter **Bernadette Linsbichler**, deren Erziehung wegweisend war und ohne deren Liebe, Unterstützung und Rückhalt bereits erreichte und auch zukünftige Ziele undenkbar wären.

Lebenslauf

Name Linsbichler, Bernadette
Geburtsdatum 29.2.1980
Geburtsort Wien, Österreich
Adresse Bahngasse 17, 7161 St.Andrä am Zicksee, Österreich

Ausbildungsdaten

2008 Hospitanz (1 Monat), chirurgische Pferdeklinik, Vetsuisse Fakultät, Universität Zürich

2007-2009 Dissertation und Mitarbeit in der MSRU (Muskuloskeletal Research Unit) unter der Leitung von Prof.Dr.vet.med. Brigitte von Rechenberg (DECVS), Pferdeklinik, Vetsuisse Fakultät, Universität Zürich

2006-2007 Rotating Internship, Pferdeklinikum, Veterinärmedizinische Universität Wien

2006 Jungakademikertraining (5 Monate), Klinik für Chirurgie und Augenheilkunde Pferd, Veterinärmedizinische Universität Wien

2006 Hospitanz (1 Monat), Royal Dick School of Veterinary Studies, Clinic for Equine Orthopaedics and Surgery, Edinburgh

2005 Hospitanz (1 Monat), chirurgische Pferdeklinik, Vetsuisse Fakultät, Universität Zürich

2004-2005 Anstellung als wissenschaftliche Hilfskraft, Pferdeklinikum, Veterinärmedizinische Universität Wien

1998-2006 Studium Veterinärmedizin, Veterinärmedizinische Universität Wien

1998 Reifeprüfung, Bundesgymnasium und Bundesrealgymnasium Neusiedl am See

Wissenschaftliche Arbeiten

Linsbichler, B., Windischbauer, G., Mayrhofer, E., Haslauer, E., Dreiseitel, H., Hoffmann-Parisot, M.: Digitales 2D-und 3D-Fluoroskop für Ausstellungs- und Unterrichtszwecke; Posterpräsentation, Gemeinsame Jahrestagung der Österreichischen, Deutschen und Schweizerischen Gesellschaft für Biomedizinische Technik, St.Virgil/Salzburg, Österreich, 24.-27.9.2003

Markon, K., Linsbichler, B., Strele, C., Hois, A., Rubel, F., Windischbauer, G.: Computerstimulation der Seehundestaupe-Epidemien 1988 und 2002, Posterpräsentation, Gemeinsame Jahrestagung der Österreichischen, Deutschen und Schweizerischen Gesellschaft für Biomedizinische Technik, St.Virgil/Salzburg, Österreich, 24.-27.9.2003